



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE CHIAPAS
CENTRO DE ESTUDIOS SOBRE LA UNIVERSIDAD



**DETECCIÓN MOLECULAR Y GENOTIPIFICACIÓN
DEL VPH EN POBLACIÓN GENERAL
DE LA FRONTERA SUR DE MÉXICO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS PARA LA SALUD**

PRESENTA

Sara Vázquez Corzo PS293

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Karina del Carmen Trujillo Murillo

TAPACHULA, CHIAPAS

NOVIEMBRE DE 2021



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas
Noviembre 23 de 2021
Oficio No. CESU/CG/276/2021

C. Sara Vázquez Corzo

Candidata al Grado de Doctora
en Ciencias para la Salud
P r e s e n t e

Por medio del presente informo a Usted, que una vez recibidos los votos aprobatorios de los miembros del Comité Tutorial de la tesis intitulada:

DETECCIÓN MOLECULAR Y GENOTIPIFICACIÓN DEL VPH EN POBLACIÓN GENERAL DE LA
FRONTERA SUR DE MÉXICO.

Se le AUTORIZA que lleve a cabo la impresión definitiva de cinco ejemplares de la tesis y dos ejemplares en formato disco compacto, los cuales deberá entregar:

- Un ejemplar de la tesis en formato disco compacto: anexas oficio de autorización de impresión de tesis Dirección de Desarrollo Bibliotecario de la Universidad Autónoma de Chiapas
- Cinco tesis impresas y un ejemplar en formato de disco compacto Área de Titulación del CESU para ser entregadas a los Sinodales.

Asimismo, se le informa que podrá consultar los requisitos de entrega de tesis en la página web de la Dirección de Desarrollo Bibliotecario en www.biblioteca.unach.mx

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente

"Por la Conciencia de la Necesidad de Servir"

Mtro. Oel García Estrada
Coordinador General



C.c.p. Expediente/archivo
M'UGE/eaga

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque me ha permitido llegar hasta esta etapa de mi vida y me dio fuerzas para lograr esta meta " Porque nada hay imposible para Dios". Lucas 1:37

A mi Familia porque siempre me han alentado a seguir adelante, por darme todo su amor y comprensión en momentos de debilidad, dejándome apoyarme en ellos y recordarme siempre que me aman.

A mis maestros y asesores

Dra. Karina del Carmen Trujillo Murillo por todos los consejos, confianza y conocimientos que me ha brindado en este tiempo, y confiar en mí para la realización de este proyecto.

Dr. Ángel Lugo Trampe, por su tiempo, sus enseñanzas, y la confianza brindada.

Dra. Marisol Espinoza Ruíz, por los conocimientos transmitidos y la disponibilidad para cualquier duda y su apoyo incondicional para realizar esta meta.

Al personal del laboratorio "Genodiagnostica", a mis compañeros de trabajo por su apoyo de manera incondicionalmente para llegar a cumplir esta meta en mi vida "Dios los bendiga".

DEDICATORIAS

A Dios, que me ha enseñado que lo que a veces, no sucede en años, Dios los puede hacer en un solo día porque Él es El Dios que hace que lo imposible se haga posible.

A mis padres porque ellos me guiaron por el camino del bien, y me enseñaron a confiar en Dios y lograr cada una de mis metas en mi vida.

A mis hermanas y hermano porque ellos siempre me apoyaron en cada paso de mi vida y siempre me impulsaron a seguir adelante y lograr mis metas.

A mi esposo e hijos, por darme las fuerzas para lograr cada una de mis metas y siempre me recuerdan el gran amor que siento por mí.

A las personas que han estado conmigo durante todo este tiempo, enseñándome, ayudándome, apoyándome y por su tiempo a lo largo de este proceso tan importante para mí, "Dios los bendiga".

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
Lista de cuadros	i
Lista de figuras	ii
Lista de tablas	iii
Abreviaturas	iv
Resumen	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Epidemiología del cáncer cervical	4
2.2. Características y tipos de VPH	5
2.3. El genoma del VPH	6
2.4. Proteínas virales	7
2.4.1. Proteínas no estructurales o tempranas	7
2.4.2. Proteínas estructurales o tardías	9
2.4.3. La cápside viral	9
2.5. Historia natural de la infección por VPH	9
2.6. Transmisión del VPH	11
2.7. Cofactores de adquisición	12
2.8. Riesgo de progresión. Cofactores	13
2.9. Cofactores virales de persistencia-progresión	13
2.10. Cofactores genéticos de persistencia-progresión	14
2.11. Cofactores medioambientales de persistencia-progresión	14
2.12. Cofactores de invasión	15
2.13. Técnicas de detección	15
2.13.1. Métodos basados en el diagnóstico citológico	16
2.13.2. Citología cervical	16
2.13.3. Citología líquida	16
2.13.4. Colposcopia	17

2.14. Métodos moleculares para la detección de VPH	17
2.14.1. Métodos de amplificación de la secuencia diana	18
2.15. Prevención	23
2.16. Vacunas	24
2.17. Dificultades para la detección de cáncer cervical	25
III. ANTECEDENTES	27
IV. JUSTIFICACIÓN	30
V. OBJETIVOS	31
5.1. Objetivo general	31
5.2. Objetivos específicos	31
VI. METODOLOGÍA	32
6.1. Población de estudio	32
6.2. Lugar de estudio	32
6.3. Tipo de estudio.	32
6.4. Tamaño de muestra	32
6.5. Encuesta sobre características epidemiológicas	32
6.6. Procesamiento de la información	32
6.7. Estrategias de cribado.	33
6.8. Procedimiento de toma de muestra	33
6.9. Extracción del ADN en muestras cervicales	34
6.10. Control de calidad PCR punto final (β -Globina)	35
6.11. Diagnóstico por CPI/CPII	36
6.12. Evaluación de dos métodos por qPCR	37
VII. RESULTADOS	41
7.1. Recolección de las muestras.	41
7.2. Control de calidad de las muestras	42
7.3. Identificación cualitativa de VPH mediante CPI/CPII SYBR Green	42
7.4. Evaluación del diagnóstico de muestra positivas por el método qPCR SPF10	43
7.5. Diagnóstico citológico	49

LISTA DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
Cuadro 1. Clasificación de los VPH según su riesgo oncogénico . . .	6
Cuadro 2. Proteínas virales del VPH y sus funciones	6
Cuadro 3. Comparación de los cuatro métodos en base al número de resultados positivos	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1. Historia natural de la infección cervical por VPH. reproducido de Puig-Tintoré, <i>et al.</i> 2006	10
Figura 2. Estrategia general de la metodología empleada	33
Figura 3. Control de calidad de las muestras recolectadas	42
Figura 4. Identificación cualitativa de VPH mediante CPI/CPIISYBR Green, para una región de 188 pb ubicada en el gen que codifica para la proteína E1	43
Figura 5. Curvas de amplificación emitidas por el termociclador LightCycler® 2.0 de ROCHE, evaluación de las 27 muestras positivas diagnosticadas por CPI/CPII	44
Figura 6. Curvas de Disociación emitidas por el termociclador LightCycler® 2.0 de ROCHE	44
Figura 7. Curvas de disociación de las muestras dudosas se observan comportamientos distintos, además de coinfecciones por más de un genotipo	45
Figura 8. Curvas de amplificación de las muestras negativas por CPI/CPII.	46
Figura 9. Curvas de disociación de muestras negativas por CPI/CPII	46

LISTA DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
Tabla 1. Condiciones de reacción para amplificar un fragmento del gen de β -Globina	35
Tabla 2. Programa de amplificación para un fragmento de 262 pb del gen β -Globina por PCR	36
Tabla 3. Condiciones de reacción para el diagnóstico por CPI/CPII	36
Tabla 4. Condiciones de reacción para amplificación por PCR con CPI/CPII	37
Tabla 5. Condiciones de Reacción para la evaluación de CPI/CPII SYBR Green	37
Tabla 6. Condiciones de amplificación para la evaluación de CPI/CPII SYBR Green	38
Tabla 7. Condiciones de amplificación para la PCR del fragmento E1	38
Tabla 8. Condiciones de amplificación para qPCR SYBR Green E1	39
Tabla 9. Condiciones de reacción de SPF10 por qPCR	39
Tabla 10. Condiciones de amplificación para qPCR SYBR Green SPF10	40
Tabla 11. Características demográficas y clínicas de las 344 mujeres participantes en la detección molecular y genotipificación del VPH	41

ABREVIATURAS

CaCu	Cáncer cervicouterino
VPH	Virus del papiloma humano
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
ADN	Ácido desoxirribonucleico
PML	Proteína de leucemia promonocítica
NK	Células asesinas naturales
HLA (ALH)	Antígeno leucocitario humano
RCP (PCR)	Reacción en cadena de la polimerasa
HC (CH)	Captura de híbridos
OPS	Organización Panamericana de la Salud
LCR (RLC)	Región larga de control
E (early)	Temprano
L (late)	Tarde
EGF (FCE)	Factor de crecimiento epidérmico
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VHS	Virus herpes simple
Pap	Papanicolaou
ARN	Ácido ribonucleico
VLPs	Partículas similares al virus
ASC-US	Células escamosa atípicas de significancia indeterminada
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
MC	Curvas de disociación
PD	Dímeros de cebadores
Ng	Nanogramo

Detección molecular y genotipificación del VPH en población general de la frontera sur de México

Introducción. El virus del papiloma humano (VPH) es el virus que se transmite con más frecuencia a través de la vía sexual.^{1,8} La evaluación de la prevalencia de la infección varía dependiendo del método diagnóstico y población en estudio; según la Organización Mundial de la Salud (OMS) los genotipos más frecuentes en México son 16,18 y31.^{6,7} En Chiapas el 5 Y 10 % de los casos se detecta en las fases iniciales de la enfermedad; esta situación dificulta en buena medida el tratamiento y lo vuelve más costoso e incierto para las mujeres, sus familias y el sistema de salud. En el presente estudio se validó y aplicó un ensayo de qPCR cuantitativa para la genotipificación del virus del papiloma humano en muestras de cérvix de población general.

Objetivo. Detectar y genotipificar mediante un ensayo de qPCR al virus del papiloma humano en muestras de cérvix de población general

Material y métodos. Se procesaron 344 muestras de raspados cervicales, a las cuales se les realizó diagnóstico citológico, captura de híbridos, identificación cualitativa de VPH utilizando cebadores degenerados CPI/CPII, y mediante qPCR para SPF10.

Resultados. En la citología cervical se obtuvo 8 positivas a LIBG, en el tamizaje por captura de híbridos se observaron 42 positivas a VPH, en la identificación cualitativa de VPH por la técnica de PCR punto final utilizando los cebadores CPI/CPII se obtuvo una prevalencia de 24% de VPH (82/344), y al evaluar por qPCR para SPF10 se obtuvo una prevalencia del 15% (55/344).

Discusión. El ensayo qPCR SPF10 con SYBR Green adaptado por Micalessi *et al.*, en el 2012 resultó ser más eficiente, al realizar la amplificación del gen E1, descrito por Seaman *et al*, en el 2010 y realizar pruebas *in silico* se comprobó que el primer ensayo no cumplía los requerimientos necesarios para la amplificación. La PCR punto final CPI/CPII se adaptó para ser reproducido en la plataforma en Tiempo Real, pero presentando algunos inconvenientes, como el requerimiento de grandes cantidades de muestra para su empleo, en tanto que para el ensayo SPF10 requirió bajas concentraciones de ADN para su empleo (~30 ng), ya que si se utiliza cantidades mayores inhibían la PCR.

Conclusión. La infección por VPH es un problema de salud pública en nuestro país, el diagnóstico citológico no es suficiente, para su detección oportuna debe complementarse con pruebas moleculares para detectar el ADN viral y determinar su genotipo.

Palabras claves: VPH, cáncer cervical, LIBG, genotipos

I. INTRODUCCION

Según la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer, a nivel mundial y durante el 2018, el cáncer cervicouterino (CaCu) ocupa el octavo lugar con 569,847 casos, de un total de 18, 078,967 casos nuevos de todos los cánceres registrados en ambos sexos y en todas las edades. Entre la población femenina mundial del año pasado, el CaCu ocupa el cuarto lugar, solo por debajo de los casos nuevos de cáncer de pulmón (725,352), cáncer colorrectal (823,303) y cáncer de mama (2,088,849); en ese mismo año, el padecimiento produjo 311,365 muertes, y eso le permitió ubicarse en el mismo lugar que la incidencia (International Agency for Research on Cancer. World Health Organization 2019); mientras que las estimaciones de las tasas de incidencia y de mortalidad para CaCu estandarizada por edad fueron de 13.1 y 6.4 por cada 100,000 mujeres de todas las edades, respectivamente. Cuando se estima la tasa de mortalidad estandarizada por edad para CaCu en mujeres de 45-74 años de edad, está se incrementa hasta 20.7 por cada 100 mil mujeres, lo cual indica que la tasa de mortalidad incrementa con respecto a la edad (International Agency for Research on Cancer World Health Organization 2019). Desde 2006, el CaCu es un problema de salud pública ya que representa la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres mexicanas. En el 2018, en México se registraron 27,157 casos de displasia cervical leve y moderada, 3,332 casos de displasia cervical severa y CaCu *in situ*, y 2,375 casos de tumores malignos del cuello uterino; en todas las etapas de la enfermedad mencionadas anteriormente, Chiapas contribuyó con el 0.69%, 1.77% y 2.61% de casos, respectivamente (Secretaría de Salud Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 2019). El CaCu es una enfermedad multifactorial, que involucra factores socioeconómicos, culturales, inmunológicos y epigenéticos, así como una infección persistente por el virus del papiloma humano (VPH), generalmente transmitido por los hombres, quienes debido a sus conductas sexuales presentan más probabilidad (40%-60%) de estar infectados que las mujeres¹. Al inicio de las relaciones sexuales, cerca del 20% de las mujeres contraerán el Virus de Papiloma Humano (VPH), aunque la mayor incidencia del virus se registrará en mujeres de 35-40 años de edad. Las mujeres sexualmente activas de

cualquier edad, pueden infectarse con VPH's oncogénicos o de alto riesgo. Sin embargo, el CaCu invasor en mujeres jóvenes infectadas con virus oncogénicos es raro y la prevalencia de VPH en mujeres de 40 años o mayores no se correlaciona con la alta tasa de CaCu. La persistencia de VPH's oncogénicos es lo que da lugar al desarrollo de lesiones precancerosas y potencialmente a cáncer invasor ². Las lesiones precancerosas más comunes son de origen de células escamosas, llamadas neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC), y se clasifican según la proporción del epitelio anormal. El NIC I indica una infección activa por VPH y estas lesiones se consideran de bajo grado con una alta tasa de regresión espontánea; estas lesiones generalmente no se tratan. Las lesiones de bajo grado, pueden progresar hacia lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado, caracterizadas por displasia moderada y grave. Estas etapas corresponden al NIC II y al NIC III o carcinoma *in situ*. A menudo el NIC II se considera una lesión de alto grado, pero tiene una tasa de regresión espontánea de hasta 40%, mientras que las lesiones NIC III tienen la mayor probabilidad de progresión a invasión y son tratadas universalmente. El tiempo estimado para la progresión de NIC III a cáncer es en promedio de 10 años, lo que brinda oportunidades para que estas lesiones se identifiquen y se traten³. Se han descrito diversos tipos de CaCu, entre los que destacan el carcinoma escamoso, en sus diferentes variantes histológicas (90-95%), y el adenocarcinoma cervical (<5%). Otros cánceres cervicales menos frecuentes son los sarcomas, y recientemente se ha descrito un melanoma maligno primario de cuello uterino⁴. La forma histológica más comúnmente encontrado en las mujeres es el carcinoma escamoso (80% de los casos) y está más frecuentemente asociada al VPH 16. El adenocarcinoma es el segundo tipo histológico más común y aunque el VPH 16 también es el más frecuente, la proporción de los genotipos 18 y 45 aumentan significativamente en este tipo de tumores¹. La detección oportuna de CaCu depende del apego de las mujeres al tamizaje, lo cual en diversos casos resulta difícil porque las pacientes desconocen la edad requerida para el estudio y la frecuencia con que debe realizarse la citología cervical, por los prolongados tiempos de espera en las unidades de salud, porque sus parejas les prohíben practicarse el estudio, o porque desconocen sobre los factores

de riesgo de la enfermedad, incluso en mujeres con educación a nivel superior, por problemas económicos o por falta de acceso a los servicios de salud, entre otros factores epidemiológicos. Las instituciones de salud, principalmente las públicas también contribuyen a la problemática del CaCu, porque a veces no cuentan con una cobertura aceptable, regularmente no cuentan con insumos, recursos humanos capacitados e infraestructura, que influye en el diagnóstico citológico de calidad fundamental para el diagnóstico oportuno y el tratamiento eficaz de las lesiones precancerosas^{5,8}.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Epidemiología del cáncer cervical

La infección por el VPH constituye la infección de transmisión sexual más común entre las mujeres; se estima que alrededor de 291 millones de mujeres son portadoras del virus, de las cuales 105 millones están infectadas con los genotipos de VPH 16 y 18⁹. El CaCu es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, con cifras que alcanzan 266,000 fallecimientos de mujeres cada año, los cuales suceden en su mayoría en países de ingresos bajos y medios. Hasta el 86% de los casos y el 88% de las muertes ocurren en países en vías de desarrollo¹⁰. En 2015, se reportaron más de 8.8 millones de muertes relacionadas con el cáncer en todo el mundo; El 70% de los cuales ocurrieron en países de ingresos bajos y medios y el 25% de ellos fueron inducidos por infecciones virales, como el virus de la hepatitis o el virus del papiloma humano¹. Según el informe del observatorio global del cáncer de 2018, el CaCu sigue siendo la cuarta causa más común de mortalidad por cáncer entre las mujeres en todo el mundo, y uno de los tipos de cáncer más mortales entre la población femenina en los países en desarrollo. En América Latina, los países más afectados son Nicaragua, Honduras, El Salvador y Bolivia, con tasas de incidencia superiores a 35 por 100,000 habitantes. En cuanto a la mortalidad, Puerto Rico es el único país que ha mantenido una tasa de 4 muertes por 100,000 en las últimas cuatro décadas¹⁰. En México, el CaCu ocupa el segundo lugar entre las neoplasias en la mujer y constituye uno de los principales problemas de salud pública, con una incidencia del 15.5% y una mortalidad del 12.8%. El observatorio global del cáncer reportó que la incidencia de cáncer de cuello uterino en mujeres de 39 años de edad fue de 16.7% considerando esta cifra tan alta como las de otros países en desarrollo. Al interior del país se observa una disparidad en las tasas de mortalidad, donde la población de la región norte es la menos afectada, con tasas que van de 5.3 a 7.9, en tanto que la región central registra tasas de 10.8 a 12.6 y la región sur es la que destaca, con tasas hasta de 15.4-17.53¹⁰. En México, 9,000 mujeres son tratadas anualmente por cáncer cervical y 4,000 mueren; la incidencia en 2008 fue de 19.2 y la mortalidad fue de 9.7 por 100,000 mujeres. El alto nivel de mortalidad se debe a la desigualdad social. El Programa

Nacional para la Detección del Cáncer Cervical se inició en México en 1974 y se ha observado una ligera disminución de la mortalidad desde 1992; la cual ha caído de 13.3 en 2000 a 6-8 por 100,000 mujeres en 2008⁵. En México, en el 2018, el CaCu es la segunda causa más común de mortalidad asociada al cáncer en mujeres, principalmente debido a un diagnóstico clínico deficiente durante las primeras etapas de la enfermedad. Informes previos entre 2015 y 2017 revelaron que el VPH-16 y VPH-18 son responsables de 65-75% de las lesiones cervicales precancerosas y están presentes en el 99% de los pacientes con CaCu en todo el mundo¹.

2.2. Características y tipos de VPH

Los virus del papiloma humano se caracterizan por tener envoltura y un tamaño que oscila entre 45 nm a 55 nm de diámetro, con una cápside icosaédrica de proteína¹¹. Se han identificado más de 100 tipos de VPH y hasta la fecha se han caracterizado 85 genotipos, pero solamente 15 VPH se han relacionado con el CaCu y las lesiones premalignas de esta localización y de otras zonas mucosas, actualmente denominados VPH de alto riesgo, con alto potencial oncogénico¹². Los VPH se clasifican en cutáneos y mucosos. Los tipos de VPH mucosos asociados con lesiones benignas (genotipos 6 y 11 principalmente) son conocidos como tipos de "bajo riesgo" y se encuentra preferentemente en los condilomas acuminados, mientras que aquellos tipos asociados a lesiones malignas (genotipos 16, 18, 30, 31, 33, 35, 45, 51 y 52, principalmente) son conocidos como virus de "alto riesgo". Entre ellos, los VPH 16 y 18 son los oncogénicos más comunes, que causan aproximadamente el 70% de los CaCu en todo el mundo. En el cuadro I se observa otra clasificación que incluyen a los tipos 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 70, 73, 82 y 85 como genotipos de VPH de alto riesgo¹².

Cuadro I. Clasificación de los VPH's según su riesgo oncogénico

Riesgo oncogénico	Genotipo de VPH
Alto riesgo	26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 70, 73, 82, y 85
Probable alto riesgo	53, 66
Bajo riesgo	6, 42, 84, 61, 35, 11, 54, 81, 43, 44, 62, 71, 74

Citado en: Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, *et al.* 2003.

2.3. El genoma del VPH

Existen más de 80 tipos distintos de VPH, de los cuales, al menos 25 afectan al tracto genital femenino¹³. El genoma del VPH es de ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena de 8,000 pares de bases y contiene ocho genes, dos de los cuales son los que codifican las proteínas estructurales o proteínas tardías L1 y L2. La proteína viral L1 se dispone en pentámeros, en cuyo centro se acopla L2¹⁴. Estos genes se expresan en las células diferenciadas del epitelio¹⁵. Los otros 6 genes codifican proteínas no estructurales o proteínas tempranas E1, E2, E4, E5, E6 y E7¹⁶. Los genes de expresión temprana son expresados en células no diferenciadas de la epidermis¹⁵. Las funciones de las proteínas virales se pueden observar en el cuadro 2.

Cuadro 2. Proteínas virales del VPH y sus funciones

Proteína viral	Función
E1	Acción helicasa, replicación viral y control de la transcripción
E2	Factor de transcripción viral
E4	Interacción con el citoesqueleto para ensamblaje viral
E5	Interacción con receptores de factores de crecimiento
E6	Degradación p53. Activación telomerasa, induce estabilidad genómica, interacción con dominios proteicos PDZ
E7	Degradación pRB, inestabilidad genómica
L1	Proteína mayor cápside viral
L2	Proteína menor cápside viral. Recluta genoma viral para organizarlo en la cápside

El genoma puede ser dividido en tres regiones:

La región larga de control (LCR por sus siglas en inglés) o región no codificadora, representa el 15% del genoma viral y contiene el origen de la replicación, algunas secuencias promotoras, estimuladoras y represoras de la expresión de genes y de la replicación del ADN¹⁷. La región temprana E, (por *early*) representa alrededor del 45% del genoma viral y contiene al menos siete genes. Codifica proteínas involucradas en la transcripción viral E2, la replicación del ADN viral E1 y E), la proliferación celular E5, E6 y E7 y, posiblemente, algunos pasos tardíos del ciclo viral E4. Los genes E6 y E7 son considerados *oncogenes virales* por su capacidad transformante. Las proteínas E6 y E7 en los VPH de alto riesgo pueden unirse con las proteínas celulares supresoras tumorales p53 y pRB, respectivamente, alterando la proliferación celular y la apoptosis¹⁷. La región tardía L (por *late*) comprende alrededor del 40% del genoma viral y contiene dos marcos de lectura abiertos, esenciales para la replicación viral productiva. El gen *L1* codifica para la proteína principal de la cápside; es un gen altamente conservado en los virus Papiloma de distintas especies y entre los distintos tipos de VPH, razón por la cual es uno de los blancos preferidos para el diagnóstico molecular; mientras que *L2* codifica para la proteína menor de la cápside y muestra marcadas diferencias aún entre los tipos que infectan a una misma especie¹⁷.

2.4. Proteínas virales

2.4.1. Proteínas no estructurales o tempranas

La proteína E1 corresponde a una proteína multimérica con actividad ATPasa y ADN helicasa, capaz de reconocer sitios específicos en el ADN viral, llamadas regiones de origen de replicación, formando un complejo de iniciación con la proteína E2, ciclinas (principalmente E), kinasas dependiente de ciclinas y ADN polimerasa, en la región p68, participando además proteínas de la célula huésped¹⁸. La E2 corresponde a una proteína dimérica que forma un complejo proteico con E1 antes mencionado. En este proceso, E2 es fosforilado por kinasas en los residuos aminoacídicos de serina 298 y 301, regulando su unión con E1. Además, E2 reprime al promotor P97 (VPH 16) o P105 (VPH 18), ubicado próximo al gen TATA box, encargado de la transcripción de

las proteínas E6 y E7, reduciendo de esta manera la síntesis de estas proteínas. También se ha demostrado que E2 activa directamente la síntesis de la proteína P53 lo que produciría finalmente la detención del ciclo celular en G1 y apoptosis¹⁸. Las proteínas E1 y E2 están implicadas en la replicación vírica, formando un complejo esencial como activador transcripcional del genoma vírico. E1 también contribuye al mantenimiento del virus en forma episómica y puede estar ausente cuando el ADN vírico permanece integrado. Los estudios con VPH16 han demostrado la función de E2 como regulador de la transcripción y represor de la expresión de E6 y E7, al unirse el promotor de E6 a la unión proximal de E2¹⁹. La E4 está asociada con la liberación exitosa del virus y también puede usarse como un biomarcador de infecciones activas por VPH. Esta proteína se encuentra entre la replicación temprana de los genes del VPH; sin embargo, esta proteína también se expresa durante las últimas etapas de la infección¹. La proteína E5 está unida a la membrana y participa en la transformación maligna de la célula. Sin embargo, su participación no es imprescindible, ya que a menudo el gen E5 se encuentra deletado en células de CaCu. Participa en el proceso de tumorigénesis interactuando con receptores de factores de crecimiento celular, incluyendo el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y, en el caso de VPH6, también con erbB2 y el receptor del factor de crecimiento de las plaquetas, interfiriendo en el proceso de endocitosis e inactivación de estos receptores. E5 también se une a una porina que participa en la bomba de protones endosómica, y su inactivación conduce a la inhibición en la acidificación del endosoma, incrementando la vida media del receptor EGF y favoreciendo la acción funcional del EGF de activación de los oncogenes c-fos y c-jun¹⁹. El gen E6, de ~450 a 500 pb, codifica para una proteína de casi 150 aminoácidos con un peso molecular de 16 a 18 kDa. La proteína tiene un potencial oncogénico débil en algunas líneas celulares y coopera con E7 para la plena capacidad transformante e inmortalizante²⁰. El gen E7, de ~300 a 320 pb, codifica para una proteína de ~100 aminoácidos con un peso molecular de 10 kDa. La proteína E7 tiene la mayor capacidad transformante y actúa mediante la unión a proteínas celulares supresoras de tumores de la familia pRB, que a su vez interactúan con factores de transcripción de la familia E2F²⁰.

2.4.2. Proteínas estructurales o tardías

La proteína L2, de 43 a 53 kDa, es la minoritaria de la cápside viral, que como L1, se produce en células que expresan E4²¹. La proteína mayoritaria L1, de 57 kDa y que conforma cerca del 80 % de la cápside, se expresa después de L2. La cápside contiene 360 copias de L1 y ~12 copias de L2, organizados en 72 capsómeros de una partícula icosaedra. La proteína L2 se acumula en estructuras nucleares conocidas como dominios oncogénicos de la proteína de leucemia promonocítica (PML) durante el ensamble del virus y atrae a L1 hacia estos dominios²⁰. Esta proteína L2 interviene en la entrada del virus a las células, en la localización de los componentes virales en el núcleo, en la unión al ADN, en la formación de la cápside y en la estabilidad²¹. Se ha sugerido que estos cuerpos PML son el sitio de la replicación del ADN viral y que las proteínas de la cápside se acumulan en este sitio para facilitar el empaquetamiento²⁰.

2.4.3. La cápside viral

La cápside viral está formada por dos proteínas. La proteína L1 es el elemento estructural primario, encontrándose 360 copias de la proteína organizada en 72 capsómeros en los viriones infectantes. La proteína L2 es un componente menor del virión y se cree que puede estar presente en el centro de los capsómeros pentavalentes en los vértices del virión. Ambas proteínas juegan un papel muy importante en mediar la eficiencia de la infectividad del virus²¹.

2.5. Historia natural de la infección por VPH

El conocimiento de la historia natural de la infección genital por el VPH es básico para comprender la diferencia entre infección y neoplasia causadas por el VPH. El curso habitual de la infección tiende hacia curación espontánea. De las mujeres infectadas por VPH, la gran mayoría nunca presentaran CaCu. La citología con alteraciones propias de lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL; NIC I) traduce la expresión de la infección aguda por VPH. La mayoría de dichas infecciones detectadas por citología, son transitorias y asintomáticas. Ocasionalmente, la persistencia en el tiempo de la infección puede causar la transformación neoplásica

de las células. Solo una pequeña fracción de las infecciones por VPH progresará a neoplasia intraepitelial de alto grado (HSIL; NIC II-III) y eventualmente a CaCu o, con menor frecuencia, de otras localizaciones del tracto genital inferior de la mujer, como la vagina o la vulva. En la figura 1 se resume la historia natural de la infección cervical por el VPH¹⁴. La NIC tratada con eficacia previene la progresión a CaCu; la NIC I es una lesión que solo requiere seguimiento sin tratamiento: el 10% de las NIC I progresan a NIC III o CC; el 20% de NIC II progresan a NIC III o CaCu y el 40% de las NIC II remiten espontáneamente. El manejo de la NIC I y II es controvertido: algunas remiten espontáneamente. Se trata con procedimientos destructivos a las pacientes que están en mayor riesgo de progresión, y se observa a las de bajo riesgo que remiten espontáneamente, pero es difícil predecir el resultado individual de cada paciente⁵.

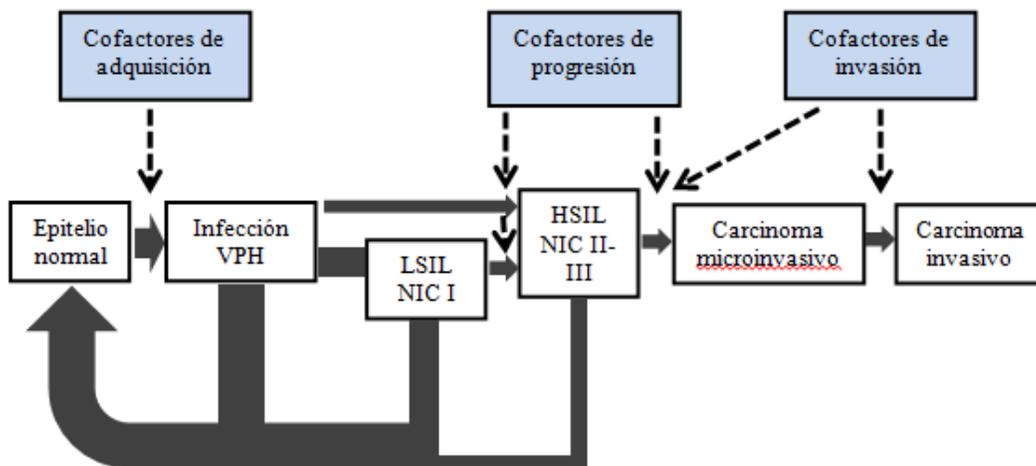


Figura 1. Historia natural de la infección cervical por VPH. Reproducido de Puig-Tintoré, et al. 2006

Tanto la mujer como el hombre pueden ser portadores asintomáticos y vehículos de la infección genital por VPH. La transmisión se produce por contactos sexuales y los órganos más susceptibles de infección con potencial de iniciar una transformación neoplásica son el cuello uterino (zona de transición) y la línea pectínea del canal anal. El ADN viral puede recuperarse del cuello uterino, vulva, vagina, canal anal, pene y escroto. Socialmente, pueden identificarse grupos de alta prevalencia en la población que ejerce la prostitución, en la población reclusa asociada al consumo de drogas y en los grupos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana²².

2.6. Transmisión del VPH

El VPH se transmite con facilidad por contacto sexual, probablemente a través de erosiones mínimas o imperceptibles de la piel o las mucosas. La vía de contagio más frecuente es la transmisión coital, si bien se ha evidenciado que la infección del área anogenital puede extenderse, por auto-inoculación, a otra localización más alta del tracto genital, como el cuello uterino¹⁶. El cuello de útero es especialmente vulnerable al contagio, por la presencia en la unión escamosocilíndrica de células epiteliales metaplásicas en diversos grados de madurez, fácilmente accesibles por los virus. En efecto, los VPH al igual que otros virus, aprovechan la maquinaria celular para replicarse y en el cuello de útero se benefician de la maduración del epitelio metaplásico para expresar sus genes de forma secuencial. En primer lugar, en las capas basales, los genes tempranos (E1... E7), y después, en las capas superficiales más diferenciadas, se expresan sus proteínas tardías (L1 y L2) que forman la cápside y permiten el ensamblaje de nuevas partículas virales que se liberan y repiten el ciclo infeccioso¹⁶. Los papilomavirus humanos también pueden alojarse de forma latente en las células epiteliales, evadiendo la detección por el sistema inmune y permitiendo una reactivación futura. Actualmente, solo hay evidencias indirectas de las infecciones latentes de VPH en humanos, pero se especula que aun cuando el VPH no pueda ser detectado en una muestra en un momento dado, permanece la posibilidad de que el virus se encuentre en forma latente². La infección por el VPH se puede clasificar en: primero una infección latente, que se caracteriza por la presencia de VPH en las

células o tejidos que son aparentemente normales y sin ninguna manifestación de enfermedad. Sin embargo, el virus está ahí y en ocasiones puede ser detectado por técnicas específicas como hibridación *in situ* o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Posteriormente la infección subclínica se manifiesta por cambios microscópicos en el epitelio cervical (coilocitos, displasias) detectados en las citologías o cortes histológicos de los tejidos afectados. La presencia de VPH en este punto se puede verificar mediante el uso de un colposcopio que evidencia cambios de coloración en el cuello uterino después de aplicar una solución de ácido acético; estos cambios se asocian a la infección con VPH y una posible lesión premaligna. Finalmente, la infección clínica se manifiesta por la aparición de tumores visibles y es en esta etapa donde podemos encontrar gran cantidad de tejido positivo para VPH. Estos virus se encuentran viables y con capacidad de infectar otros tejidos. Sin embargo, no siempre la enfermedad se manifiesta durante esta última etapa ya que varios casos llegan a permanecer en periodo de latencia o subclínico, tiempo durante el cual se puede adquirir un estado de resistencia o regresión de las lesiones, o bien de progresión hacia un cáncer invasor².

2.7. Cofactores de adquisición

La infección por VPH se adquiere sexualmente por más del 50% de todos los adultos sexualmente activos al menos una vez en su vida. Por otra parte, se ha comprobado que la infección aumenta en aquellas que tienen más parejas sexuales⁴. El riesgo de contagiarse por el virus está relacionado con el comportamiento sexual de la mujer: edad del primer coito, número de compañeros sexuales y relaciones sexuales con hombres que tienen o han tenido múltiples parejas sexuales¹⁶. En México, en promedio la juventud inicia su vida sexual entre los 15 y los 19 años (CONAPO, 2010). La edad y el incremento en el número de parejas sexuales están asociados con la posibilidad de reinfecciones, principalmente cuando interactúan con sexoservidores(as) según Melo y Waliszewski²⁴.

2.8. Riesgo de progresión. Cofactores

La infección por VPH de alto riesgo se considera una causa necesaria, pero no suficiente, del cáncer cervical. Los estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que la gran mayoría de mujeres infectadas por VPH de alto riesgo nunca presentarán CaCu, solo una pequeña fracción progresará a NIC II-III y eventualmente a cáncer. Estos datos sugieren que existen otros cofactores que modulan el riesgo de progresión de la infección VPH a cáncer. Las características de la actividad sexual, anteriormente referidos, se vinculan con la probabilidad de contraer la infección por VPH, pero no se consideran relacionados con la progresión a cáncer¹⁶. Los cofactores de progresión, favorecedores de la persistencia de la infección por VPH se clasifican en virales, genéticos y medioambientales¹⁶.

2.9. Cofactores virales de persistencia-progresión

Genotipo viral. El seguimiento de mujeres infectadas con VPH de alto riesgo con citología inicial negativa muestra notables diferencias en la progresión a NIC III según el tipo de VPH de alto riesgo presente al inicio del estudio. Los VPH 16 y 18 tienen el mayor riesgo de progresión¹⁵.

Variantes del VPH. El reconocimiento de mínimas variaciones en la secuencia de bases del ADN del VPH ha permitido identificar las variantes. Las variantes del VPH 16 muestran diferencias geográficas que se han relacionado con diferentes riesgos de cáncer, las variantes no europeas están asociadas con un mayor riesgo¹⁵.

Carga viral. La carga viral es un marcador de infección persistente. Se ha sugerido que una carga viral elevada indica una mayor posibilidad de integración del ADN viral en el genoma del huésped¹⁵.

Integración. La integración del ADN viral en el ADN del huésped parece ser crucial en la transformación maligna. Como la integración es en parte un evento al azar, el riesgo de que ocurra aumenta con una elevada carga viral. La presencia del ADN de VPH de alto riesgo en las células del huésped da lugar a la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH, y a su interacción con los genes supresores tumorales p53 y Rb respectivamente. Este proceso altera la función de estos genes supresores, activando

la división celular, afectando la reparación del ADN y disminuyendo la apoptosis, lo que conduce a la inmortalización celular. El reconocimiento de este mecanismo molecular ha permitido el desarrollo de nuevos marcadores de progresión¹⁵.

2.10. Cofactores genéticos de persistencia-progresión

Las variaciones genéticas individuales de los genes relacionados con la respuesta inmunitaria innata, humoral y celular pueden influir en la persistencia de la infección VPH y su progresión a cáncer. En las superficies mucosas, la primera línea de defensa frente a la infección es la respuesta inmune innata, mediada por las células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés), que induce la apoptosis de las células infectadas por el virus y de las células tumorales. En la regulación de la respuesta inmunitaria celular y humoral intervienen los antígenos del sistema de histocompatibilidad HLA (antígeno leucocitario humano), entre otros. Los genes del sistema HLA han sido los más extensamente investigados. Las moléculas HLA presentan los antígenos extraños a los linfocitos T y por ello juegan un papel importante en la regulación de la función inmune¹⁶.

2.11. Cofactores medioambientales de persistencia-progresión

Paridad. Se ha establecido que mujeres con dos o más hijos tienen un riesgo 80% mayor respecto a las nulíparas de presentar lesión intraepitelial; luego de cuatro hijos dicho riesgo se triplica, después de siete se cuadruplica y con doce aumenta en cinco veces. A pesar de que no existe ninguna explicación definitiva para este fenómeno, se cree que la inmunosupresión del embarazo o su influjo hormonal aumentan la susceptibilidad por el VPH²⁵.

Anticonceptivos hormonales. El uso prolongado se asocia con mayor riesgo de lesión intraepitelial²⁵.

Tabaquismo. El tabaco produce metabolitos carcinogénicos que conllevan a anormalidades celulares, disminución de la inmunidad e incremento de la displasia²⁶. El tabaquismo parece estar firmemente asociado con la aparición de lesiones cervicales precancerosas y cáncer. El tabaquismo se encuentra entre los cofactores

ambientales más uniformemente identificados con la probabilidad de influir en el riesgo de padecer CaCu; los estudios revelan que el riesgo para las fumadoras actuales al menos duplica el de las no fumadoras.

Inmunodepresión. Las mujeres infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) contraen más fácilmente los tipos del VPH de alto riesgo y tienen mayor probabilidad de presentar lesiones precancerosas (y de aparición más rápida), que las mujeres seronegativas para VIH, del mismo grupo etario.

Infecciones asociadas. Las mujeres con coinfección por el VPH y otro agente de transmisión sexual, como *Chlamydia trachomatis* o virus herpes simple tipo 2 (VHS-2), tienen mayor probabilidad de presentar CC que las mujeres sin coinfecciones²⁷.

Educación. La falta de una cultura centrada en la sexualidad ha mermado la salud en hombres y mujeres. Factores culturales tales como algunas costumbres y tradiciones nos enseñan que es un tabú hablar de sexualidad y pocas son las familias que conversan sobre este asunto con sus hijos, por miedo a incitarlos o inducirlos a las prácticas sexuales. La inexistencia de una cultura sólida de la educación sexual en México, aunque exista la intención derivada de los planes y programas de la Secretaría de Educación Pública y de la Secretaría de Salud, la información no ha sido precisa ni eficaz, no ha generado una conciencia del cuidado del cuerpo y la poca educación que generalmente se brinda en casa, es insuficiente para el cuidado de la salud reproductiva de niños y adolescentes²⁴.

2.12. Cofactores de invasión

Es difícil precisar cuál es la tasa de progresión de NIC III a CC ya que no es ético no tratar a dichas pacientes. En un estudio publicado en 1976 se estimó que entre las mujeres no tratadas un 28-39% progresaban a cáncer invasivo. La observación colposcópica de vasos atípicos constituye un signo de progresión e invasión. En el año 1972 estas observaciones permitieron especular la posible existencia de un factor angiogénico responsable de este proceso. Actualmente está bien aceptado que la progresión de la neoplasia intraepitelial a cáncer invasivo requiere la expresión de factores angiogénicos que estimulan la proliferación de nuevos vasos. Esta neo-

angiogénesis, inducida por el factor de crecimiento del endotelio vascular y otras proteínas como la angiogenina, es fundamental para el crecimiento del tumor, la invasión del estroma y la producción de metástasis¹⁶.

2.13. Técnicas de detección

2.13.1. Métodos basados en el diagnóstico citológico

El método tradicional de detección oportuna de CaCu en México ha sido la citología cervicovaginal con tinción de Papanicolaou²⁸. La citología es el estudio de células individuales que tiene el propósito de detectar anomalías morfológicas de las células examinadas que provienen de la descamación de superficies epiteliales, de líquidos corporales o bien de células que se obtienen por aspiración con aguja²⁹.

2.13.2. Citología cervical

La citología cervical o cérvico-vaginal, estudia las células exfoliadas de la unión escamo columnar del cuello uterino y ha sido por años el principal método de búsqueda de CC, ampliamente reconocido por Programas de Control y Prevención del Cáncer como una herramienta de laboratorio que ha reducido la incidencia y mortalidad por CaCu²⁹. El reporte citológico mediante el sistema Bethesda (modificado en 2001) es el que actualmente se emplea en los programas de detección. En México, la Secretaría de Salud lo implementó a nivel nacional hace ~10 años. El Papanicolau (Pap) tiene una alta sensibilidad del 75% y una especificidad del 95%, con una tasa de resultados falsos negativos que varía del 5%-50% pero al repetir el estudio esta tasa varía de 1%-2%³⁰.

2.13.3. Citología líquida

La citología convencional presenta algunos inconvenientes como el proceso manual de extensión de las células en el portaobjeto hace imposible la estandarización, las células se distribuyen de manera desigual, hay superposiciones difíciles de interpretar debido a presencia de moco cervical, sangre o células inflamatorias¹⁵. Con el propósito de reducir los falsos negativos y mejorar la prueba de Papanicolau como examen

diagnóstico para CaCu y sus precursores, se han desarrollado nuevas técnicas entre ellas está la citología líquida²⁹. La citología líquida es una técnica nueva para el procesamiento de las muestras de citología en la cual la muestra se toma como en la citología convencional pero se utiliza un dispositivo de toma al que se puede desprender el cepillo o una combinación de espátula plástica y cepillo endocervical, pero a diferencia de la citología convencional en la que se realiza el extendido inmediatamente en el portaobjetos, en este método el extremo del cepillo desprendido se introduce en una solución fijadora en donde se conservan y dispersan las células, en el laboratorio la muestra es recolectada y concentrada selectivamente a través de filtros y luego transferidas al portaobjetos para su tinción y posterior interpretación. Debido a que la muestra es fijada inmediatamente después de su recolección y que en el proceso se elimina materiales que puedan oscurecer la evaluación de las células epiteliales como sangre, moco y células inflamatorias, hay pocos artefactos en la morfología celular, además las células son depositadas en una sola capa celular (monocapa) todo esto facilita la observación celular³¹.

2.13.4. Colposcopia

La colposcopia es una nueva técnica complementaria para la exploración del tracto genital inferior. Su objetivo es la localización y descripción topográfica de las lesiones del tracto genital inferior. Se establece una sensibilidad del 95% cuando se diferencia entre colposcopia normal y anormal, con una especificidad del 45%. La colposcopia y la citología utilizadas conjuntamente ofrecen un valor predictivo negativo para NIC III o superior del 100%³².

2.14. Métodos moleculares para la detección de VPH

La llegada de herramientas de biología molecular ha facilitado la detección del ADN de VPH, además de mostrar alta sensibilidad. Actualmente, existen diferentes técnicas moleculares para la detección del ADN de HPV, entre los que se encuentran la hibridación de ADN, amplificación de la señal positiva y de ácidos nucleicos; hibridación de ácidos nucleicos. Éste último es el método más sensible para la

detección de VPH en muestras biológicas, ya que es capaz de identificar varios genotipos de ese virus³³.

2.14.1. Métodos de amplificación de la secuencia diana

Reacción en cadena de la polimerasa (RCP): La amplificación de genes mediante RCP permite obtener millones de copias a partir de un fragmento de ADN particular. Detecta la presencia de ADN de la región de la cápside o del oncogen E6 del VPH¹⁹. Detección de ARNm E6/E7. El proceso carcinogénico es regulado por las oncoproteínas E6 y E7 del VPH y, por lo tanto, la expresión excesiva de estos genes es un marcador de riesgo para cáncer de cuello uterino. Se ha postulado que la detección de la expresión de oncogenes E6/E7 podría ser más específica y predecir mejor el riesgo de cáncer que la prueba ADN-VPH. Existen al menos dos métodos que usan la detección del ARN, la prueba Aptima de ARNm E6/ E7 (Gen-Probe), que detecta 13 tipos de VPH de alto riesgo y el VPH 66, y la prueba PreTect HPV-Proofer (NorChip), que detecta el ARN de los tipos de VPH 16, 18, 31, 33 y 45³⁴.

Captura de híbridos. La captura híbrida de segunda generación (del inglés: Hybrid-Capture Second Generation o HC2), se basa en la amplificación de la señal basado en la hibridación del ADN del VPH con sondas de ARN marcadas. El método se limita a reportar con una sensibilidad de 96 a 98% y una especificidad entre 1 y 8%³⁵.

Detección de marcadores de progresión oncogénica. Los biomarcadores representan una herramienta poderosa para el monitoreo del curso del cáncer y la evaluación de la eficacia y seguridad de nuevos agentes terapéuticos, también representan un importante indicador biológico del estatus (condición) y progresión del estado fisiológico de la célula en un momento específico. La mayor parte de los biomarcadores identificados hasta el momento son marcadores de transformación asociada a la infección por VPH y que se pueden identificar después o durante una infección activa, más que en la infección aguda³⁵.

Proteína p16INK4a. Es un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas, que regula negativamente la proliferación celular y, por ende, inhibe la hiperfosforilación de pRb a través de los complejos ciclina D-cdk4/cdk6. En carcinomas cervicales se ha

observado que la inactivación de pRb por E7 de VPH resulta en la sobreexpresión y acumulación de p16INK4a en las células, por lo que se considera que esta proteína es un marcador subrogado de la expresión de E7 de VPH, asociada al desarrollo del cáncer³³.

Ki67. Es un marcador de proliferación, en general se expresa en todas las fases del ciclo celular, excepto G0. Discrimina la proliferación a partir de células en reposo. Por lo tanto, es un excelente marcador de la fracción de células en crecimiento y ayuda a determinar específicamente la actividad de esta fracción.

E-cadherina se expresa en la superficie de la normalidad epitelial de las células y es la principal molécula mediadora de la adhesión célula-célula en los epitelios. Se ha implicado en la carcinogénesis, como la pérdida de E-cadherina y su expresión ha sido detectada en los cánceres epiteliales. Esto facilita la célula tumoral invasión y metástasis y por lo tanto ha sido asociada con mal pronóstico en los carcinomas³⁶.

La detección e identificación de VPH's es una prueba complementaria y/o alternativa al estudio citológico. Está indicada especialmente en los resultados dudosos del estudio citológico (ASC-US y AGUS) y para predecir el potencial oncogénico en las lesiones de bajo grado. También permite confirmar el diagnóstico y predecir el potencial evolutivo a corto plazo en las lesiones de alto grado. Así mismo, es de utilidad como prueba de cribado en población asintomática para complementar la baja sensibilidad del test de Papanicolaou, y también como prueba para realizar el seguimiento post- tratamiento (conización, resección, radioterapia, quimioterapia o histerectomía).

Los métodos de detección de VPH se basan en la detección del ácido nucleico vírico ya que las pruebas serológicas muestran una escasa correlación con la clínica. Actualmente los sistemas más utilizados para la detección del ADN vírico utilizan algunas de las siguientes estrategias:

a). Métodos basados en PCR convencional genérica asociada a un sistema de identificación de VPHs:

-Amplificación de secuencias consenso de los Papilomavirus: Se basan en la utilización de oligonucleótidos consenso, diseñados en regiones conservadas; como

los ORFs L1, E6 y E7^{37,38,39}. Estos sistemas rinden un producto de amplificación común a varios genotipos, cuyo análisis mediante una técnica complementaria permite la identificación del tipo vírico. Se han utilizado dos sistemas de oligonucleótidos de forma mayoritaria, cuyas características se describen a continuación: - Los oligonucleótidos degenerados MY11 Y MY09⁴⁰ permiten obtener un producto de amplificación común del gen L1 de 450 pb aproximadamente, dependiendo del tipo vírico. A pesar del tiempo transcurrido desde el diseño de estos iniciadores de la PCR, la práctica demuestra que pueden seguir utilizándose para la detección de la mayoría de los VPH's descritos recientemente. El sistema basado en los oligonucleótidos PGMY11/PGMY09⁴¹. Es en realidad una mezcla de 5 oligonucleótidos en sentido directo homólogos a MY11 y 13 en sentido inverso homólogos a MY09. Los oligonucleótidos GP5/GP6 permiten obtener un fragmento del gen L1 de 140 pb aproximadamente, dependiendo del tipo vírico. Los oligonucleótidos GP5/GP6 pueden utilizarse internamente al fragmento MY11/09 para la realización de amplificaciones anidadas. El sistema basado en los oligonucleótidos GP5+/GP6+⁴² permite aumentar el espectro de tipos víricos detectados con los oligonucleótidos originales. Oligonucleótidos genéricos utilizados como iniciadores de la PCR para la detección de papilomavirus en muestras clínicas.

La PCR permite obtener cantidades detectables de una secuencia específica de ADN, pero requiere de una técnica complementaria que posibilite visualizar y/o caracterizar los productos de la amplificación. Desde el punto de vista clínico es muy importante identificar el tipo vírico presente en la lesión, o al menos conocer si trata de un virus de alto o bajo riesgo. Por ello, la detección de VPH debe combinarse con un sistema de identificación de tipo vírico:

- 1). Secuenciación del ADN: es el método de referencia para la identificación de papilomavirus. No obstante, no suele ser de aplicación en el laboratorio de rutina dado los costos, el tiempo necesario para la realización de la técnica y las necesidades de manipulación.

2). El método de Fujirebio dispone del sistema comercial *INNO-LiPA® HPV Genotyping Extra* basado en la utilización de oligonucleótidos específicos de los tipos víricos fijados en una membrana de nylon. Se suministran las tiras de Nylon ya preparadas con sondas específicas o semi-específicas que permiten distinguir entre 28 tipos de papilomavirus.

3). El Sistema Molecular de Roche (RMS) dispone de un sistema similar, ensayo de formación lineal para la detección de VPH (Linear Array HPV Assay) y que permite identificar entre 37 tipos. Está basado en la amplificación del fragmento de 450 pb del gen L1 delimitado por los oligonucleótidos MY11 y MY09. Actualmente esta compañía dispone del sistema (*AMPLICOR® Human Papillomavirus Test*) para la detección y el tipado de papilomavirus que permite detectar 13 tipos de alto riesgo, con un límite de detección de 100 copias del genoma vírico por cada ensayo.

4). Genómica dispone del sistema comercial CLART® HPV2. Está basado en la amplificación del fragmento MY11-MY09 marcado con biotina y en su hibridación con una matriz de baja densidad o formación de oligonucleótidos dispuesta en un tubo o microplacas. Permite identificar 35 tipos diferentes de VPH's.

5). Luminex dispone del sistema X-map. Consiste en una hibridación sobre nanosferas en suspensión. Cada nanosfera se fabrica con polímero plástico de una tonalidad específica de rojo distinguible de las demás. Cada nanosfera es recubierta con una sonda diferente, lo que permite identificar el ADN de la muestra mediante hibridación, El analizador Luminex utiliza tecnología de citometría para conseguir un flujo de esferas aisladas. Además, incorpora dos fuentes de luz láser que inciden simultáneamente sobre la misma nanosfera. Una de ella excita el color rojo de la nanosfera y la distingue del resto. La otra luz emite en la longitud del verde y permite identificar en qué nanosfera se ha producido hibridación con el ADN de la muestra (marcado químicamente). La aplicación desarrollada para la detección e identificación de VPH's permite detectar 24 tipos diferentes. Según algunos estudios, este sistema presenta una sensibilidad ligeramente inferior a la obtenida mediante la amplificación del fragmento MY11-MY09 y visualización en gel de agarosa del producto de amplificación⁴³.

La PCR en tiempo real es una variante de la PCR convencional cuyo objetivo es amplificar y cuantificar el producto amplificado. Para ello se utilizan sondas marcadas con fluoróforos que emiten fluorescencia en caso de amplificación. El ciclo de la PCR en el que se detecta inicialmente un aumento significativo en la señal de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN, presente en la muestra. *Laboratorios Roche* ha desarrollado el sistema comercial *Cobas® HPV test* basado en esta técnica. En el mismo ensayo se consiguen detectar 14 tipos de VPH de alto riesgo e identificar dos de ellos (VPH16 y VPH 18) en diferentes canales. Además, en otro canal diferente, se amplifica el gen de la beta-globina como su control interno. El sistema (*BD Onclarity HPV Assay*) para ensayar al virus de papiloma permite detectar 14 tipos de VPH de alto riesgo mediante esta técnica. Este método incluye la amplificación de un fragmento del gen de la beta globina humana como control interno. Los resultados son interpretados mediante un programa informático. *Los laboratorios Abbott* dispone del sistema comercial *Real Time High Risk HPV* basado en esta técnica. Consigue detectar 14 VPH de alto riesgo y genotipificar los VPH16 y 18. Al igual que en los sistemas anteriores, utiliza la amplificación del gen de la beta- globina como control interno. *El ensayo para detección Anyplex™ II HPV HR Detection* (Seegene) se basa en PCR a tiempo real combinándolo con las tecnologías TOCE Y DPO para detectar e identificar 14 tipos de VPH de alto riesgo en una sola reacción. Además, permite cuantificar la carga viral. También utiliza un sistema de control interno. Los resultados se interpretan con el programa Seegene Viewer.

Hibridación en Solución y Captura de híbridos. La técnica de hibridación consiste en la incubación en solución de ADN vírico presente en la muestra con varias Sondas de ARN específicas de diferentes genotipos, aprovechando la mayor estabilidad. De los híbridos ADN-ARN, frente a los de ADN. No precisa una purificación previa del ADN a partir de la muestra y pueden utilizar el líquido residual de la citología líquidas es sencillo rápido y económico y tiene la gran ventaja de que permite realizar una semi cuantificación de la carga viral. Se trata del sistema más reproducible de todos los métodos desarrollados y la sensibilidad es sólo ligeramente inferior a la de los protocolos basados en la PCR⁴⁴. Tiene el inconveniente de que el empleo de sondas

específicas de tipo limita la detección aun número fijo de VPH's, no permitiendo detectar aquellos cuya sonda no esté incluida en el sistema. El sistema comercial *Digene HC2 HPV DNA Test (QIAGEN)* se basa en esta técnica. Utiliza 18 sondas específicas de tipo separadas en dos soluciones con las sondas de los papilomavirus de alto (13 sondas) y bajo riesgo (5 sondas) respectivamente. Las sondas de los tipos de alto riesgo corresponden a las VPH's: 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59y69. Dado que las sondas están agrupadas, no permite determinar específicamente el tipo de VPH presente en la muestra ni las coinfecciones.

2.15. Prevención

Los programas de detección y control del CaCu son fundamentados en la epidemiología y en las acciones de la prevención primaria, secundaria y terciaria¹³. La prevención primaria del cáncer se basa en el presupuesto de que la promoción de la salud puede reducir la exposición de la población a factores de riesgo del cáncer, con el objetivo de reducir la incidencia de la enfermedad. Otra opción, son las vacunas contra el VPH antes del comienzo de la vida sexual¹³. Vacunar a niñas y mujeres antes de su iniciación sexual y, por tanto, de que puedan infectarse con el VPH, supone una oportunidad excelente para reducir la incidencia del CaCu a largo plazo³³. No obstante, no hay que olvidar que estas vacunas ofrecen protección contra los tipos del VPH responsables de ~70% de los casos de CaCu, por lo que seguirán siendo necesarias las pruebas de detección para las mujeres que se vacunen, del mismo modo que para las que no lo hagan¹⁴. Por tanto, un enfoque integral en la prevención y el control del CaCu implicará vacunar a niñas y mujeres antes de iniciar vida sexual, examinarlas para detectar lesiones precancerosas y ofrecer un tratamiento antes de que se desarrolle la enfermedad invasiva¹⁴. La prevención secundaria incluye un conjunto de acciones que promueven el diagnóstico precoz de la enfermedad y su tratamiento inmediato, aumentar la posibilidad de cura, mejorar la calidad de vida y la supervivencia y disminuir la mortalidad por cáncer¹³. Para la detección de lesiones precancerosas se puede recurrir a diversos métodos, entre ellos la prueba de Papanicolaou, la inspección visual del cuello del útero con ácido acético o la prueba

de ADN para VPH. Cada uno de estos métodos tiene ventajas y desventajas específicas, así como unos requisitos determinados para los sistemas sanitarios que los países habrán de tener en cuenta al planificar los programas de detección¹⁴. La prevención terciaria engloba las actividades para la rehabilitación y prevención de las complicaciones derivadas de la enfermedad. Mas el control del cáncer depende esencialmente de acciones en las áreas de la promoción de la salud, protección específica y del diagnóstico precoz de la enfermedad¹³.

2.16. Vacunas

Recientemente, en México y muchos países latinoamericanos, se introdujeron programas universales de inmunización con algunas de las dos vacunas disponibles para la profilaxis de las infecciones por VPH: a) Vacuna bivalente, con dos proteínas antigénicas no infecciosas, para VPH 16 y 18³³. b) Vacuna tetravalente, con cuatro proteínas antigénicas para HPV 16, 18, 6 y 11. Las dos últimas para la prevención de verrugas genitales y/o papilomatosis respiratoria recurrente³³. El fundamento básico de la producción de vacunas profilácticas, es que cuando la proteína L1, de la cápside del VPH, son expuestas entre ellas, mediante expresión en cultivos celulares eucariotas, tienen la característica de autoensamblarse, formando unas estructuras tridimensionales vacías que se han denominado VLP's (partículas similares al virus). Las VLP's son morfológicamente idénticas a los viriones VPH nativos, siendo la única diferencia la falta de material genético del virus. Las VLP's purificadas se utilizan como antígenos y resultan ser altamente inmunogénicas cuando son presentadas al sistema inmunitario. Al mismo tiempo, al no contener material genético, no pueden causar infección en el huésped¹¹. En la actualidad existen dos vacunas VPH profilácticas ampliamente comercializadas a niveles internacionales y autorizados a nivel global su administración desde enero de 2011, una es Gardasil®, vacuna tetravalente que incluye los VPLs de los tipos de VPH 6, 11, 16 y 18, y la otra es Cervarix®, vacuna bivalente que incluye los VPLs de los tipos de VPH 16 y 18^{33,34}.

2.17. Dificultades para la detección de cáncer cervical

El conocimiento sobre la historia natural del CaCu permite identificar de manera oportuna sus lesiones precursoras y así prevenir el cáncer invasor. Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), el CaCu se puede prevenir y curar a bajo costo y riesgo, siempre y cuando esté disponible un proceso de tamizaje eficiente que facilite la detección oportuna de lesiones precursoras, junto con un diagnóstico apropiado, tratamiento y seguimiento⁴⁵. En los países en desarrollo, los programas de tamizaje basados en la citología no han tenido el éxito deseado, en la detección temprana del CaCu, debido a que se requieren múltiples recursos para realizar cada uno de los pasos del programa y no siempre se cuenta con ellos. Los programas de detección oportuna del CaCu han demostrado ser efectivos en la mayoría de los países desarrollados, pero en países que aún están en vías de desarrollo como México, los resultados no han sido tan satisfactorios. Algunas evaluaciones de la calidad del programa nacional de detección de CaCu han encontrado problemas de acuerdo a su baja eficiencia y efectividad, sobre todo en aspectos de baja cobertura, especialmente en áreas rurales, asistencia tardía a la realización de la prueba, baja productividad de cobertura de primera vez en la realización de la prueba, falta de calidad en la toma de las muestras para citología cervical, bajos índices de sensibilidad y especificidad, baja concordancia inter-observador (citotecnólogos); en forma general, falta de calidad en los servicios de atención a las mujeres⁴⁶. Las mujeres con una condición socioeconómica baja, con frecuencia tienen limitaciones para acceder a los servicios de atención médica, muestran una nutrición deficiente y escasa sensibilización acerca de los temas de salud y prácticas preventivas. Todos esos factores favorecen la aparición de enfermedades que pueden prevenirse, como el CaCu⁴⁷. En los países en desarrollo, donde se presenta 80% de todos los casos nuevos, se ha estimado que solo el 5% de mujeres se han realizado una prueba de Papanicolau en los últimos diez años. Un estudio realizado en una población rural menciona que las mujeres que nunca se han hecho una citología habitan en zonas rurales y en las zonas con menor índice de riqueza⁴⁸. Existen otros factores como la mala atención de parte del personal de salud, el dolor/incomodidad durante la toma

de muestra, el realizar largas filas o trámites dispendiosos para acceder al servicio de salud, la demora en la entrega o pérdida del resultado del examen, y como consecuencia la pérdida de tiempo y dinero que eso genera, algunas mujeres prefieren recurrir a servicios privados o simplemente no practicarse la citología cervical⁴⁷. Por otro lado, la falta de conocimiento sobre la utilidad e importancia de realizarse la citología cervical trae como consecuencia que algunas mujeres no se realicen la prueba en tiempo y condiciones adecuadas; así también el miedo al diagnóstico de cáncer, al no conocer el procedimiento de esta prueba, se piensa que podría ser un examen doloroso. Mostrar la parte más íntima de su cuerpo a otros, aun considerando que sea su pareja o familiar cercano, no es una experiencia que se viva sin sentimientos de vergüenza. El cuerpo censurado y controlado en la mayoría de los espacios de la vida cotidiana, es una vivencia que repercute en las dificultades para acudir a la prueba de citología cervical y posiblemente a las campañas de los programas de detección oportuna del CaCu⁴⁷. Un conocimiento y una capacidad técnica limitados de los citotecnólogos dan como resultado la obtención de muestras inadecuadas y un alto índice de diagnósticos falsos negativos⁴⁹. En México, las deficiencias se relacionan con la baja cobertura y calidad del servicio: la obtención de especímenes para realizar citología vaginal exfoliativa es deficiente, los índices de diagnóstico de falsos negativos en centros de lectura de citología ginecológica son muy elevados, las mujeres acuden al servicio para detección tardíamente y existe una cobertura baja del programa de Detección Oportuna del CaCu en áreas rurales⁵⁰.

III. ANTECEDENTES

Se han realizado números estudios para validar las pruebas para detectar al CaCU en mujeres en edad productiva; utilizando la prueba de Papanicolaou con muestra de células cervicales, para determinación de anormalidades celulares, se obtuvo una sensibilidad del 50-84%, y especificidad del 91-99% de esta prueba en este estudio se encontro principalmente lesiones cervicales ASCUS, LEIS I-III^{51,52}. Otro estudio utilizando la prueba de Colposcopia mediante revisión directa de biopsia determinaron lesiones visibles como NIC2/Cáncer *in situ* mostro una sensibilidad del 81-95% y una especificad de 24-63%⁵³. Mediante las pruebas Virapap/Vira type se detectó ADN de VPH en muestras de mujeres con CaCU se obtuvo una sensibilidad del 43-57% y una especificidad del 83-96% en mujeres diagnosticadas con cáncer invasor ⁵⁴. Un estudio realizo captura de híbridos 2 (CH2) a nivel poblacional para la detección de HPV. Este sistema detecto 13 tipos de HR-HPV (-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59 y -68) y 5 de bajo riesgo (LR) (-6, -11, -42, -43 y -44) y por ser semi-cuantitativo es capaz de detectar hasta 1pg de DNA de HPV/mL de muestra. En otro estudio evaluaron CH2 y AMPLICOR para detectar en VPHar en pacientes con ASCUS. La concordancia entre el HC2 y Ensayos Amplicor fue de 235/271 muestras (86,7%), con una estadístico kappa de 0,73 0,04, y VPHar fue encontrado en 160/271 Muestras por HC2 y AMPLICOR (59%) y 156/271 (58%), respectivamente⁵⁵. Otro estudio encontró una fuerte concordancia entre el tipo de HPV que se encuentra en muestras con lesiones tempranas antes del desarrollo de carcinoma de cuello uterino y el tipo de HPV que se encuentra en muestras de biopsia del cáncer invasivo, lo que indica que la neoplasia se asocia con algún tipo de VPH de tipo específico^{56,5758}. En estudios recientes se determinó mediante la prueba de Cervista® VPHAR y Cervista® VPH tipos 16/18 específicas que han demostrado ser complementarias con 100% de sensibilidad para la detección de NIC3+ y 98% para NIC2+, entre mujeres con diagnóstico citológico de ASCUS (*Atypical Squamous of Undetermined Significance*, o Escamoso Atípico de Significancia Indeterminada) que son VPH-AR positivas⁵⁹. Esta prueba fue aprobada por FDA para la detección de mujeres con citología de ASC-US que requieren ser referidas a colposcopia, así como para ser utilizada en conjunto

con la citología en mujeres mayores de 30 años. La FDA aprobó la prueba de HC2 para la detección de pacientes referidas a colposcopia, donde presentaron una citología ambigua de ASC-US y para el tamizaje de mujeres ≥ 30 años de edad, en conjunto con la citología⁶⁰. En recientes estudios poblacionales han demostrado el alto valor clínico que tiene la detección de VPH en general. Asimismo, se ha demostrado que la prueba de HC2 es altamente sensible (93-98%) y específica (60-85%) para detectar lesiones de alto grado, lo que la hace ideal para tamizaje, por ser una herramienta útil cuando se combina con la citología para el diagnóstico de lesiones de alto riesgo en mujeres con citología normal, lo que puede incidir en reducir el riesgo a desarrollar CaCu^{61,62}. De los sistemas que utilizan la amplificación de ácidos nucleicos, existen al menos siete diferentes pruebas que utilizan el RCP como base, y son ampliamente sensibles y específicas. Los protocolos de VPH-RCP hacen uso de los oligonucleótidos consenso MY09/11 o GP5+/6+, los cuales permiten la detección de un gran número de VPH's en una sola reacción y pueden ser genotipificados por polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Sin embargo, el sistema no funciona adecuadamente para infecciones múltiples, por lo que se desarrolló la hibridación reversa donde, además de la identificación del ADN viral, también se puede tipificar a los VPH en un solo paso^{41,51,63}. Existen diversas variaciones de este sistema como son la prueba INNO-LiPA® (*Line Probe Assay*, Innogenetics, Bélgica), CLART® HPV2 (*Genómica*, España), Clinical Arrays® HPV (*Genómica*, España) y el *Linear Array*® (*Roche Mol Diagnostics*, USA). Este último (*Linear Array*®) es uno de los sistemas de detección de VPH más completos, ya que incluye hasta 36 sondas en su última versión para tipos de VPH de alto y bajo riesgo⁴¹.

Se ha demostrado que estas pruebas difieren en la sensibilidad: LiPA es capaz de identificar de 10 a 100 copias de ADN de VPH 16 y 18, mientras que *Linear Array*® requiere de 10 a 100 veces más copias de ADN viral para obtener un resultado positivo. Estos sistemas de genotipificación poseen alta sensibilidad (>95%) para detectar NIC2+, pero baja especificidad para detectar las lesiones de bajo grado, lo que las vuelve herramientas importantes para tamizaje de la infección por VPH a nivel

poblacional⁶³. La detección de ADN del VPH como indicador de la presencia del virus no determina la existencia de una infección activa, por lo que debe ser acompañada de otro sistema de diagnóstico. La carga viral del VPH se ha sugerido como un biomarcador de infección persistente porque las anomalías citológicas en lesiones NIC2/3 y CaCU son más comunes en pacientes con elevada carga viral⁶⁴. La carga viral se determina por RCP en tiempo real, como un sistema altamente sensible y específico, el cual, además de poder genotipificarse en el mismo ensayo, es altamente reproducible, rápido y puede aplicarse en un gran número de muestras clínicas a la vez. Dos sistemas de diagnóstico han sido recientemente desarrollados a partir de esta metodología, los cuales han sido empleados en estudios epidemiológicos, el *Abbott Real Time HR-HPV* (*Abbott Mol GmbH & Co. Alemania*) y el *COBAS® 4800 HPV* (*Roche Mol Diagnostics, USA*) Ambos sistemas detectan 14 tipos de VPH-AR en una sola reacción y, por medio de un sistema de detección multicolor, pueden diferenciar por separado a los tipos 16 y 18; sin embargo, la sensibilidad de *COBAS® 4800* para detección de NIC2 es más alta (95-97%) que la del sistema de *Abbott* (93-95%), con una especificidad similar para ambas pruebas^{65,67,66}. Ambos sistemas han sido utilizados ampliamente en la población y validados clínicamente para detección de lesiones de alto grado a partir de ASCUS, aunque aún no han sido liberados para su uso comercial por la FDA^{68,69,70}.

IV. JUSTIFICACION

El CaCu, es un problema de salud pública, es la tercera causa de cáncer más común en México y la quinta causa de muerte en todo el mundo. Desafortunadamente afecta a mujeres con desventaja económica, social y cultural, y por ende, es mucho más común en países en vías de desarrollo donde se estima que en 2018 hubo unos 570,000 nuevos casos (el 84% de los nuevos casos mundiales). En 2018, murieron de CaCu unas 311,000 mujeres; más del 85% de esas muertes de mujeres se produjeron en países de ingresos bajos y medios. En contraste en países desarrollados ocurre únicamente el 3.6% de nuevos casos⁷¹.

El CaCu posee una etiología viral y las investigaciones unen sus esfuerzos en entender mejor las bases moleculares de la enfermedad y como ciertas oncoproteínas del virus del papiloma humano (HPV) interactúan con la maquinaria celular y la respuesta inmune⁷². Aunque el tamizaje poblacional con examen de Papanicolaou fue introducido en Latinoamérica a comienzos de los años 60, la reducción de las tasas de incidencia y mortalidad de países desarrollados no ha sido replicada en la región. Las tasas de mortalidad por CaCu no cambiaron entre 1975 y 1990 en América, con excepción de Canadá y de Estados Unidos⁷³, posiblemente con algunas limitaciones como el subregistro. La disminución gradual de la tasa de mortalidad en México, que inició a principios de los años noventa, ha sido más rápida en los últimos seis años, como resultado de la confluencia de diversos factores, tales como el incremento en cobertura, creación de servicios de colposcopia y centros oncológicos, la mejoría de la infraestructura, equipamiento y formación de recursos humanos (SSA 2007-2012). Uno de los principales temas en México, igual que en otros lugares del país como Chiapas la cobertura de atención está distante de ser la adecuada, existen datos que sugieren que solo entre el 5 Y 10% de los casos se detecta en las fases iniciales de la enfermedad; esta situación dificulta en buena medida el tratamiento y lo vuelve más costoso e incierto para las mujeres, sus familias y el sistema de salud. En este sentido en el presente estudio se validó y aplicó un ensayo de qPCR cuantitativa para la genotipificación del virus del papiloma humano en muestras de cérvix de población general.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Detectar y genotipificar mediante un ensayo de qPCR al virus del papiloma humano en muestras de cérvix de población general.

5.2. Objetivos específicos

5.2.1. Determinar la frecuencia de VPH en muestras de cérvix de población general.

5.2.2. Identificar los genotipos de VPH de alto y bajo riesgo en la población de estudio mediante la aplicación del ensayo de qPCR cuantitativo desarrollado.

5.2.3. Determinar la asociación de las LIE y CaCu con los diferentes tipos de VPH.

VI. METODOLOGÍA

6.1. Población de estudio

Se incluyeron mujeres de 15 años a 76 años, que acudieron a consulta ginecológica privada para su valoración ginecológica a las que se les explicó los objetivos del trabajo y quienes verbalmente decidieron participar el estudio.

6.2. Lugar de estudio

Las muestras de raspados cervicales se obtuvieron de consultorios particulares de Ginecología en el Municipio de Tapachula de Córdoba y Ordoñez Chiapas. El tamizaje y genotipificación de las muestras se realizó en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular e Investigación “GenoDiagnóstica” en Tapachula Chiapas.

6.3. Tipo de estudio

Se desarrolló un estudio transversal descriptivo de 2017-2019.

6.4. Tamaño de muestra

Se obtuvieron un total de 344 raspados cervicales que correspondieron al mismo número de mujeres.

6.5. Encuesta sobre características epidemiológicas

Las variables de estudio fueron la presencia de VPH, el tipo de lesión cervical, la edad, el municipio, la edad de inicio de vida sexual, el número de gestas, el uso de hormonales y el diagnóstico citológico.

6.6. Procesamiento de la información

Con la genotipificación y la información contenida en la encuesta se construyó una base de datos codificada en Excell.

La base de datos se importó al programa estadístico Stata 17.0 para obtener estadísticas descriptivas como frecuencias simples y porcentajes.

6.7. Estrategia de cribado

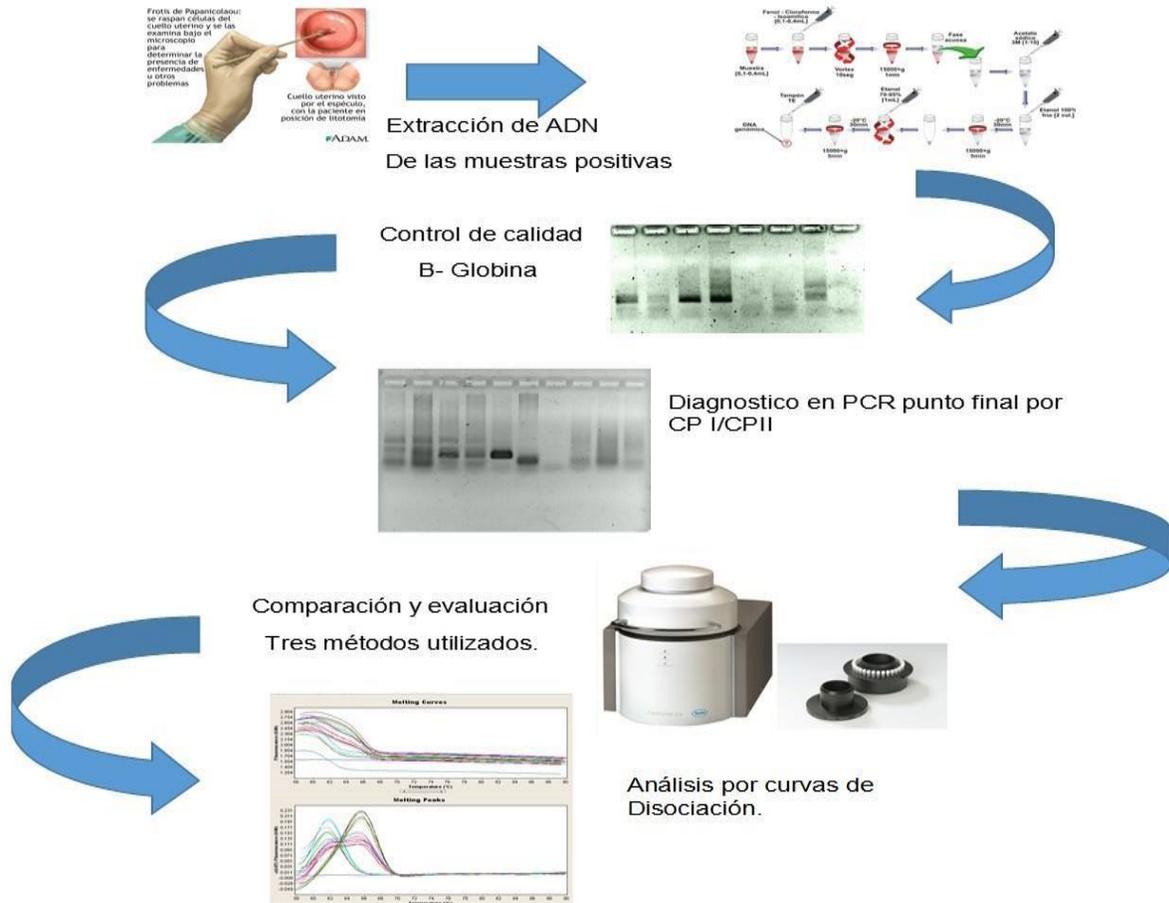


Figura 2. Estrategia general de la metodología empleada.

6.8. Procedimiento de toma de muestra

Se le indicó a la paciente acostarse boca arriba en la cama de exploración con los pies en los estribos. Como en un examen pélvico regular, se introdujo un espéculo (un instrumento usado para mantener abierta la cavidad vaginal con el fin de examinar el interior) dentro de la vagina y se abre un poco de modo que el cuello uterino esté visible.

Se observó el área con un colposcopio, un microscopio pequeño de bajo poder que se utiliza para amplificar la superficie de la vagina y el cuello uterino (es el método más preciso). Se aplicó una solución de vinagre (ácido acético) al cuello uterino para retirar el moco y ayudar a resaltar las áreas anormales. Luego, se ubicó el colposcopio en la abertura de la vagina y se examina el área. Igualmente, se pueden tomar fotografías.

Un método alternativo es la prueba de Schiller que utiliza una solución yodada para teñir el cuello uterino, la cual se introduce a través del espéculo. La solución yodada tiñe las porciones normales del cuello uterino, pero no los tejidos anormales.

Cuando se localizó una anomalía, se pudo tomar una muestra (biopsia), empleando unas pequeñas pinzas para biopsia o una aguja grande. Se puede tomar más de una muestra. Las células del canal del cuello uterino también se pueden utilizar como muestras, lo cual se denomina biopsia o legrado (raspado) endocervical que puede ayudar a identificar y localizar posteriormente células cervicales anormales. Cuando el procedimiento se ha terminado, se retiran todos los instrumentos⁷⁴.

6.9. Extracción del ADN en muestras cervicales

Técnica TSNT- Fenol- Cloroformo.

1. La muestra de raspado cervical se mezcló con Vortex y se escurrió suavemente el Citobrush por las paredes del tubo.
2. Se colectaron 200 μ L de la muestra en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se adicionó 200 μ L de buffer de lisis TSNT (2% tritón, 1% SDS, 100 μ M NaCl, 10 μ M HCl pH 8.0, 1 μ M EDTA) y mezcló por inversión durante 1 minuto.
3. se adicionaron 200 μ L de Fenol-Cloroformo- Alcohol isoamílico pH 8.0 y se mezcló en Vortex por al menos 1 minuto.
4. Se adicionaron 50 μ L de TE (tris 10 μ L, EDTA 10 μ M, pH 7.4) y se mezcló perfectamente por inversión durante un minuto.
5. Los tubos se centrifugaron por 10 min a 14,000 rpm.
6. Se recuperó la fase acuosa que se encuentra en la parte superior y se transfirió a otro tubo Eppendorf.

7. Se precipitó el ADN total agregando muy lentamente y por las paredes volúmenes de Isopropanol absoluto (o en su defecto 2 volúmenes de etanol absoluto) y se mezcló lentamente por inversión hasta obtener el ADN precipitado en forma de una hebra blanca.
8. El tubo se centrifugó 10 minutos a 14,000 rpm y se decantó el sobrenadante teniendo cuidado de no desprender la pastilla de ADN.
9. La pastilla de ADN se lavó con 0.5–1.0 ml de etano al 70% y se mezcló dos veces por inversión, se centrifugó 5 minutos a 14,000 rpm y decantó con cuidado.
10. Se dejó evaporar totalmente el etanol y posteriormente se adicionó de 50 a 100 μL de TE, para resuspender la pastilla de ADN completamente.

6.10. Control de calidad PCR punto final (β -Globina).

Tabla 1. Condiciones de reacción para amplificar un fragmento del gen de β -Globina

Reactivos	1X	10X
Agua mili Q	7.0 μL	70.0 μL
Buffer 5x (Green)	3.5 μL	35.0 μL
dNTP's 10 mM	0.3 μL	3.0 μL
F primer 5 mM	1.0 μL	10.0 μL
R primer 5 mM	1.0 μL	10.0 μL
Go taq 5u/ μL	0.2 μL	2.0 μL
DNA	2.0 μL	20.0 μL
Total	15 μL	150.0 μL

Tabla 2. Programa de amplificación para un fragmento de 262 pb del gen β -Globina por PCR.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	94°C	5 min	
Desnaturalización	94°C	30 s	40
Alineamiento	58°C	30 s	40
Extensión de Oligonucleótidos	72°C	30 s	40
Extensión final	72°C	5 min	

Para la observación de la amplificación se realizó una electroforesis con gel de agarosa al 2%, a 80 voltios por 30 minutos, el gel se tiñó con bromuro de Etidio a 2 $\mu\text{g/ml}$ por 5 minutos, y se observó en un transiluminador de luz UV y capturó la imagen con un fotodocumentador.

6.11. Diagnóstico por CPI/CPII

Tabla 3. Condiciones de reacción para el diagnóstico por CPI/CPII.

Reactivos	1X	10X
Agua mili Q	7.0 μL	70.0 μL
Buffer 5x (Green)	3.5 μL	35.0 μL
dNTP's 10 mM	0.5 μL	5.0 μL
Primer CPI 5 mM	0.9 μL	9.0 μL
Primer CPII 5 mM	0.9 μL	9.0 μL
Go taq 5u/ μL	0.2 μL	2.0 μL
DNA	2.0 μL	20.0 μL
Total	15 μL	150.0 μL

Tabla 4. Condiciones de reacción para amplificación por PCR con CPI/CPII.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	94°C	5 min	
Desnaturalización	94°C	30 s	40
Alineamiento	52°C	30 s	40
Extensión de Oligonucleótidos	72°C	30 s	40
Extensión final	72°C	5 min	

Para la observación de la amplificación se realizó una electroforesis con gel de agarosa al 2%, a 80 voltios por 30 minutos, el gel se teñirá con bromuro de Etidio a 2 µg/ml por 5 minutos. Se observó en un transiluminador de luz UV y un fotodocumentador.

6.12. Evaluación de dos métodos por qPCR

1. Método por qPCR para CPI/CPII SYBR Green

Tabla 5. Condiciones de Reacción para la evaluación de CPI/CPII SYBR Green

Reactivos	1x	10x
Master Mix (Quantitect® SYBR® Green PCR Kit)	7.5 µL	75.0 µL
Mix Primers	1.5 µL	15.0 µL
H ₂ O	4.5 µL	45.0 µL
ADN	1.5 µL	15.0 µL

Tabla 6 Condiciones de amplificación para la evaluación de CPI/CPII SYBR Green

Programa	Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Rampeo
PrePCR	Desnaturalización/ Activación	95°C	10 Min		20
qPCR	Desnaturalización	95°C	30s	40	20
	Alineamiento	52°C	30s		20
	Extensión	72°C	30s		20
Melting		95°C	05s		20
		60°C	1.0 Min		20
		85°C	0.0s		0.2
Cooling		00.0	00.0		

Tabla 7. Condiciones de amplificación para la PCR del fragmento E1.

	1x	10x
Master Mix (Quantitect® SYBR® Green PCR Kit)	7.5 µL	75.0 µL
Mix Primers	1.5 µL	15.0 µL
H ₂ O	4.5 µL	45.0 µL
ADN	1.5 µL	15.0 µL

Tabla 8. Condiciones de amplificación para qPCR SYBR Green E1

Programa	Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Rampeo
PrePCR	Desnaturalización	95°C	10 Min		20
qPCR	Desnaturalización	95°C	10s	40	20
	Alineamiento	50°C	10s		20
	Extensión	72°C	30s		20
Melting		95°C	05s		20
		60°C	1.0 Min		20
		85°C	0.0s		0.2
Cooling		00.0	0.00		

2. Método por qPCR para SPF10

Tabla 9. Condiciones de reacción de SPF10 por qPCR

Reactivos	1x	10x
Master Mix (Quantitect® SYBR® Green PCR Kit)	7.5 µL	75.0 µL
Mix Primers	1.5 µL	15.0 µL
H ₂ O	5.0 µL	50.0 µL
ADN	1.0µL	10.0 µL

Tabla 10. Condiciones de amplificación para qPCR SYBR Green SPF10.

Programa	Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Rampeo
PrePCR	Desnaturalización	95°C	10 Min		20
qPCR	Desnaturalización	95°C	20 s	40	20
	Alineamiento	52°C	40s		20
	Extensión	72°C	40s		20
Melting		95°C	05s		20
		60°C	1.0 Min		20
		85°C	0.0s		0.2
Cooling			00.0		0.00

VII. RESULTADOS

7.1. Recolección de las muestras

Se recolectaron un total de 344 muestras de raspados cervicales conservadas en PBS para mantener un pH estable de las muestras. En la siguiente tabla 11 se describieron las características demográficas y socioeconómicas de las pacientes.

Tabla 11. Características demográficas y clínicas de las 344 mujeres participantes en la detección molecular y genotipificación del VPH.

Edad	n (%)
Menores de 25 años	70 (20%)
26-35 años	126 (37%)
Mayores de 36 años	148 (43%)
Total	344 (100%)
Municipio	
Acapetahua	2 (0.5%)
Cacahoatán	26 (7.5%)
Ciudad Hidalgo	1 (0.29%)
Escuintla	3 (0.87%)
Huixtla	127 (36.91%)
Mapastepec	5 (1.45%)
Tapachula	141 (40.98%)
Tuxtla Chico	39 (11.33%)
Total	344 (100%)
Inicio de vida sexual activa	n (%)
11 a 18 años	207 (60%)
19 a 32 años	137 (40%)
Total	344(100%)
Gestas	
Ninguno	71(21%)
1-2	131(38%)
Más de 3	142(41%)
Total	344(100%)
Uso de hormonales	
No	6(2%)
Si	338(98%)
Total	344(100%)
Diagnostico citológico	
Epitelio normal (EN)	83(24.13%)
Cambios celulares reactivos asociadas con inflamación	236(68.60%)
Células escamosas atípicas (ASC-US)	14(4.07)
Células glandulares atípicas (ASC-H)	3(0.87)
Lesión intraepitelial de bajo grado (LIBG)	8(2.33)

7.2. Control de calidad de las muestras

Posteriormente se extrajeron por el método TSNT- Fenol- Alcohol Isoamilico, cada una de las muestras recolectadas, se cuantificaron en un espectrofotómetro *NANODROP 2000* de *Thermo Scientific*, la integridad y pureza del ADN se comprobó mediante PCR del gen de 262 pb β -Globina. (Utaiwan Utaipat, 2016) Para dicho análisis se utilizó el termociclador *GeneAmp® PCR system 9700* de *Applied Biosystems*. Figura 3

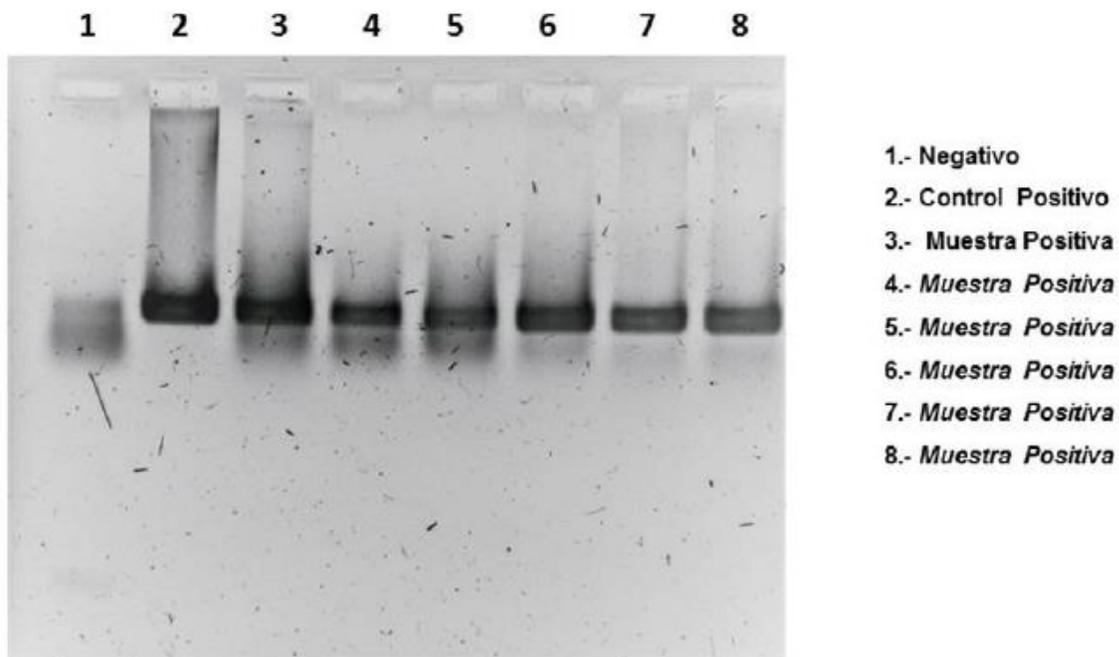


Figura 3. Control de calidad de las muestras recolectadas

7.3. Identificación cualitativa de VPH mediante CPI/CPII SYBR Green

Se utilizó la técnica PCR punto final para la identificación cualitativa de VPH utilizando los cebadores degenerados CPI/CPII para una región de 188 pb ubicada en el gen que codifica para la proteína E1. (Carrilho Carla., 2013) Para dicho análisis se empleó el termociclador *GeneAmp® PCR system 9700* de *Applied Biosystems*. Figura 4

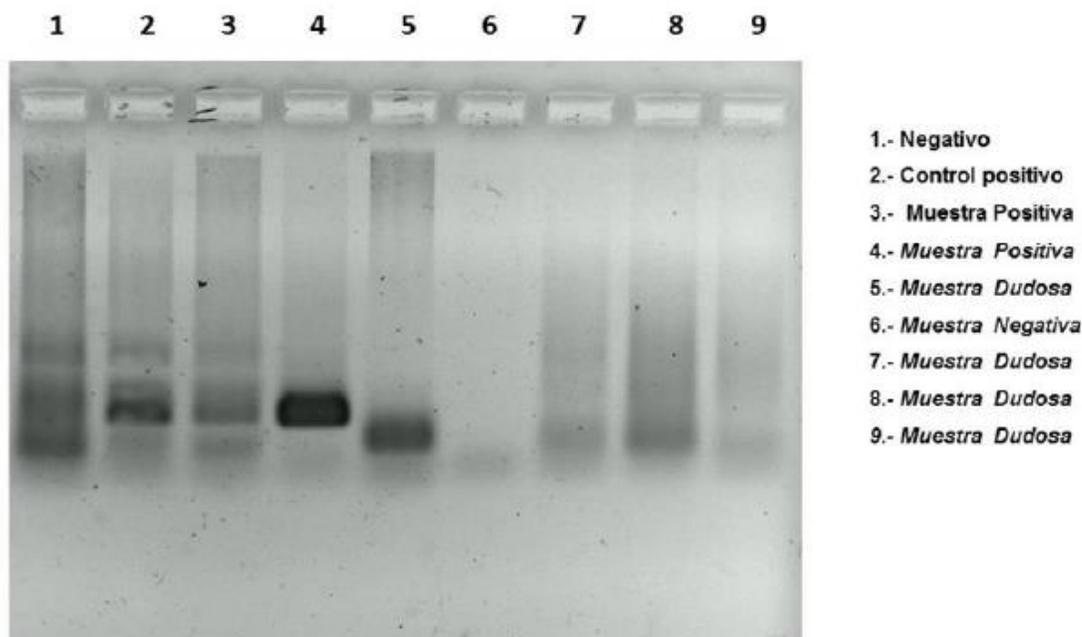


Figura 4. Identificación cualitativa de VPH mediante CPI/CPIISYBR Green, para una región de 188 pb ubicada en el gen que codifica para la proteína E1.

Mediante el diagnóstico por CPI/CPII se obtuvieron un total de 82 muestras positivas, de las cuales 27 son claramente positivas y 55 aparentemente positivas, arrojando una prevalencia del 24%.

7.4. Evaluación del diagnóstico de muestra positivas por el método qPCR SPF10.

Posterior al diagnóstico mediante PCR punto final usando los cebadores CPI/CPII se prosiguió al tamizado de las muestras claramente positivas, utilizando en método qPCR SPF10 que consta de un juego de 11 cebadores modificados que amplifican para la región L1 del VPH (Micalessi M.I y Cols., 2012). Para dicho método se usó el termociclador LightCycler 2.0® de Roche.

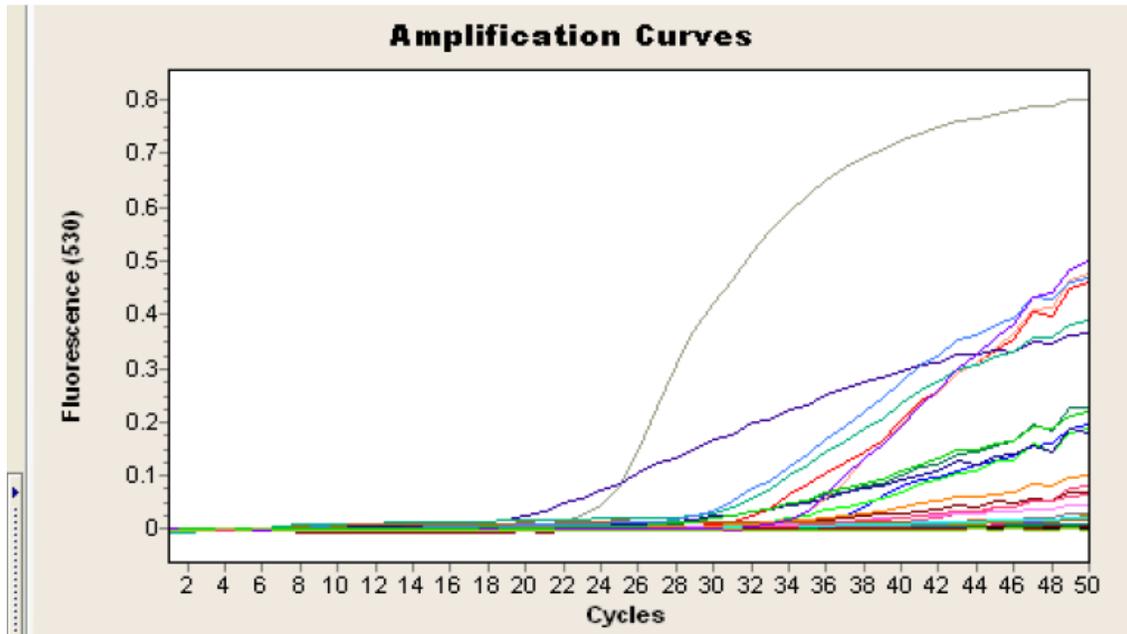


Figura 5. Curvas de amplificación emitidas por el termociclador LightCycler® 2.0 de ROCHE, evaluación de las 27 muestras positivas diagnosticadas por CPI/CPII.

De las 27 muestras tamizadas 11 no coincidieron con los resultados emitidos por CPI/CPII arrojando un total de 16 muestras positivas por el método SPF10

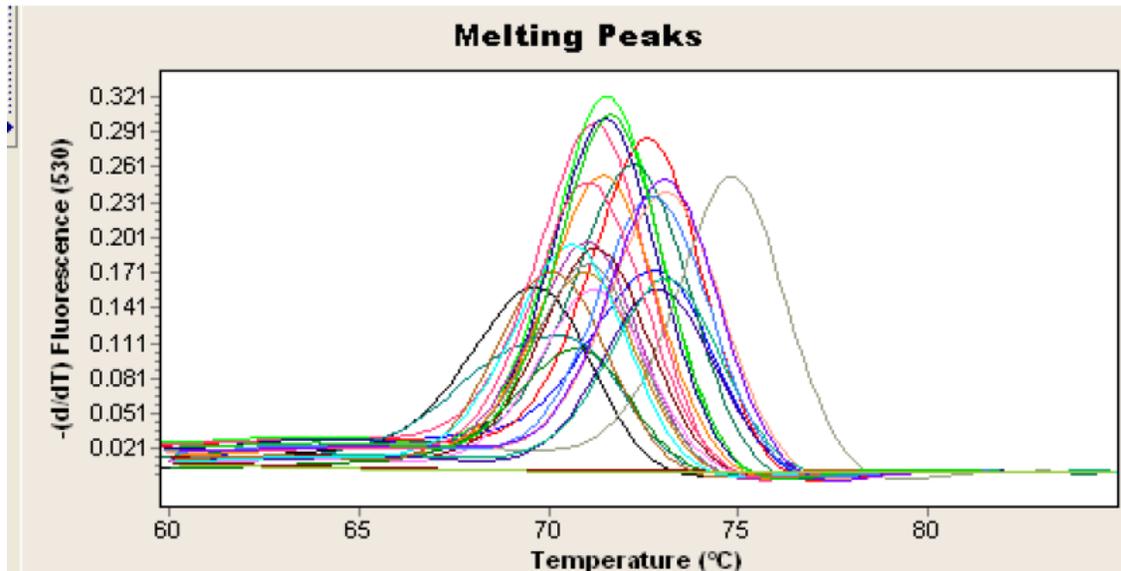


Figura 6. Curvas de Disociación emitidas por el termociclador LightCycler® 2.0 de ROCHE.

Se observaron las MC (curvas de disociación) arrojando un comportamiento diferente lo que podría indicar infección por distintos genotipos de VPH.

Posteriormente se tamizaron aquellas muestras que eran dudosas por el método de CPI/CPII para realizar las comparaciones con ambos métodos, se tamizaron un total de 55 muestras de las cuales 38 son Negativas por SPF10.

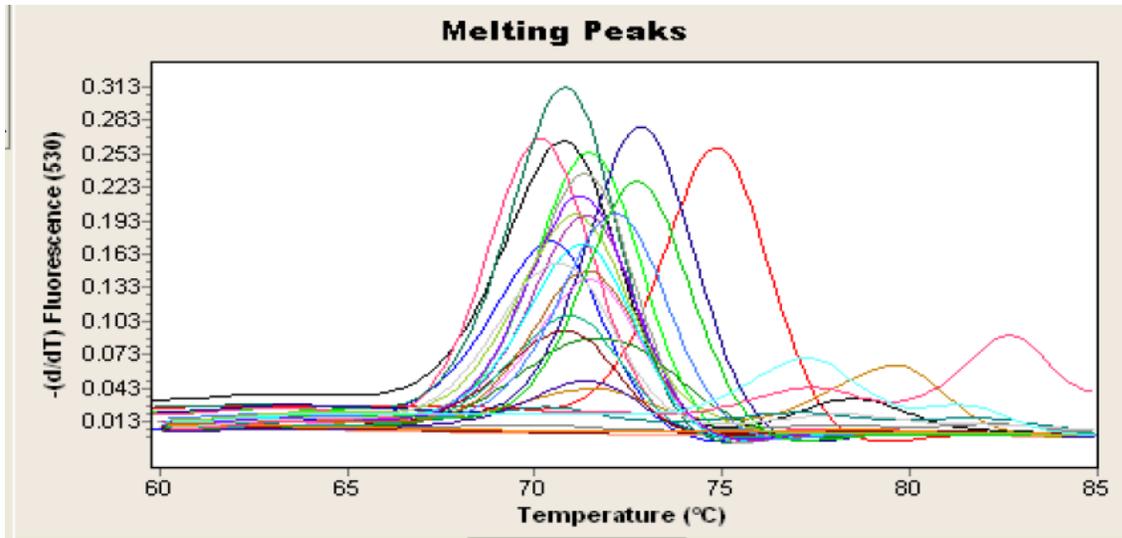


Figura 7. Curvas de disociación de las muestras dudosas se observan comportamientos distintos además de coinfecciones por más de un genotipo.

Posterior a la evaluación de las muestras positivas y las dudosas se continuó con el tamizaje de las muestras negativas por CPI/CPII de las cuales 26 dieron un resultado positivo para VPH.

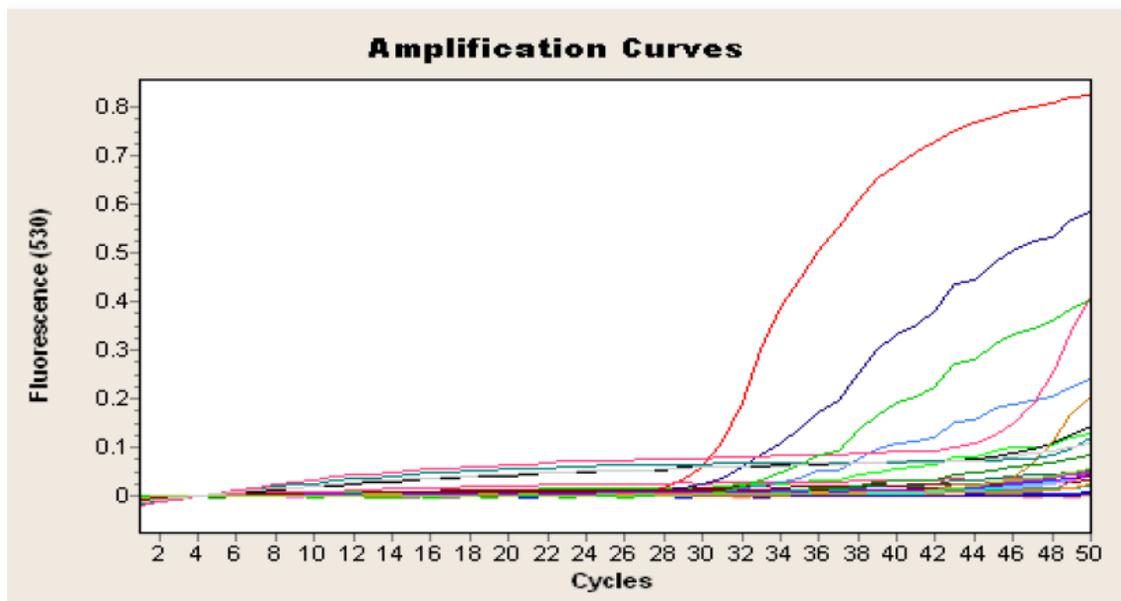


Figura 8. Curvas de amplificación de las muestras negativas por CPI/CPII.

Se analizaron las MC de las muestras restantes observando un comportamiento diferente, indicando una diversidad de genotipos en las infecciones, además de ajustar los ciclos de la PCR ya que la presencia de dímeros de cebadores (Primers Dimers) emite una leve fluorescencia la cual se observó en forma de curva todas convergiendo en el mismo punto.

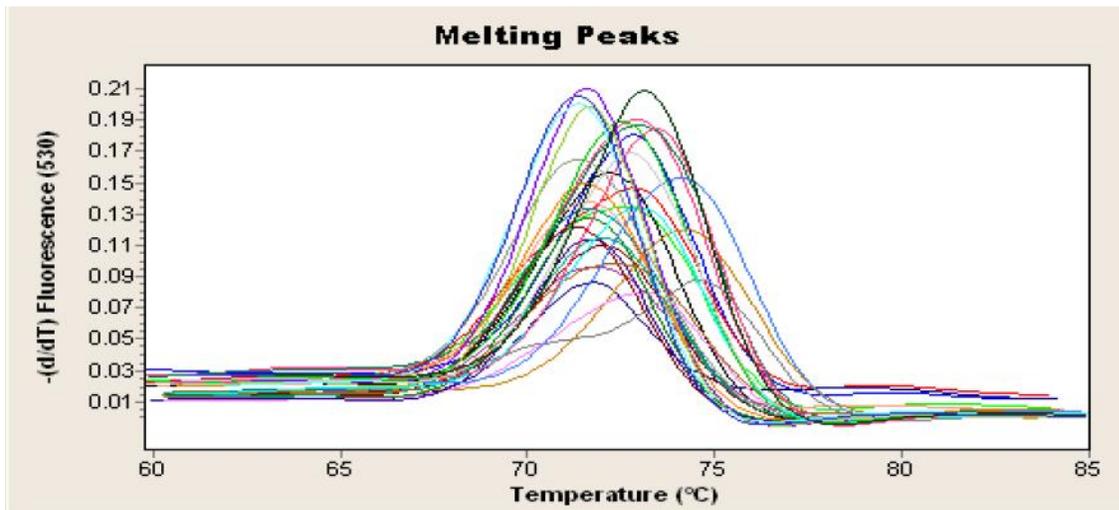


Figura 9. Curvas de disociación de muestras negativas por CPI/CPII.

De las 344 muestras analizadas por SPF10, 53 fueron positivas para VPH de las cuales sólo 16 de las positivas por CPI/CPII coincidieron con las obtenidas por SPF10, de las muestras dudosas sólo 17 coinciden con el resultado positivo y de las negativas por CPI/CPII 26 fueron positivas para SPF10. La prevalencia obtenida mediante el tamizaje de las muestras por SPF10 fue de un 15% un poco menor en comparación a la obtenida por CPI/CPII.

7.5. Diagnóstico citológico

Para complementar el diagnóstico por PCR punto final y qPCR se les realizó diagnóstico citológico a las 344 muestras obteniendo los siguientes resultados:

Cuadro 3. Comparación de los cuatro métodos en base al número de resultados positivos.

Método	Positivas	Negativas	Total
Diagnóstico citológico	8	336	344
Diagnóstico captura de híbridos	42	302	344
CPI/CPII	82 (27+) (55 dudosas)	262	344
SPF10	55	289	344

VIII. DISCUSION

Las características clínicas, el aspecto histológico y la evolución natural de las enfermedades genitales asociadas con papiloma virus dependen en gran parte del genotipo presente, así se han clasificado las lesiones dependiendo del subgrupo en categorías que permiten hacer un seguimiento médico más oportuno y de mayor calidad. En la mayoría de los casos las infecciones por VPH son subclínicas y es difícil detectarlas por examen citológico o histopatológico por esta razón los métodos moleculares como la PCR es recomendada como tamizaje para identificación de los genotipos virales.

La intención de comparar los métodos para el diagnóstico de VPH con SYBR Green por qPCR fue determinar cuál de los ensayos reportados es el más idóneo para dicho diagnóstico; con base en los resultados obtenidos, el ensayo qPCR SPF10 con SYBR Green adaptado por Micalessi *et al.*, en el 2012 resultó ser el más eficiente en comparación con otros dos métodos descritos y analizados en el presente trabajo, presentando diversas ventajas: El método basado en la amplificación del gen E1, descrito por Seaman *et al.*, en el 2010 no arrojó los resultados esperados, ya que, al realizar pruebas *in silico* se comprobó que el primer ensayo no cumplía los requerimientos necesarios para la amplificación. El método de diagnóstico por PCR punto final CPI/CPII se adaptó para ser reproducido en la plataforma en Tiempo Real, lográndose el diagnóstico, pero presentando algunos inconvenientes, como el requerimiento de grandes cantidades de muestra para su empleo, en tanto que para el ensayo SPF10 resulto ser ventajosa para este ensayo el cual requirió bajas concentraciones de ADN para su empleo (~30 ng), ya que si se utiliza cantidades mayores inhibían la PCR.

La técnica PCR punto final utilizando cebadores CPI/CPII tuvo algunos inconvenientes con respecto a la qPCR SPF10, uno de ellos fue la presencia de inespecificidad al momento de observar los productos amplificados, ya que al revelar los geles de agarosa al 2% se observaron irregularidades (de menor tamaño al esperado) en las bandas de amplificación causando controversia al analizar los resultados, además de

requerir grandes cantidades de muestra por reacción, volviéndolo un método inadecuado para el tamizaje de muestras con baja concentración de ADN.

Otra ventaja del ensayo SPF10 en comparación a CPI/CPII es el tiempo de reacción, siendo menor el establecido para SPF10, significando una gran ventaja con respecto a la rapidez para la emisión de resultados.

Otro dato importante del ensayo SPF10 es que al comparar con los datos obtenidos por el diagnóstico citológico es que se pudo determinar la presencia de VPH sin existir algún hallazgo de lesión en el tejido, siendo de suma importancia, para la detección temprana de VPH.

IX. CONCLUSIONES

En este trabajo se realizó la evaluación analítica de dos métodos para el diagnóstico de VPH por qPCR con SYBR Green, seleccionando al método descrito por Micalessi *et al.*, en el 2010, como el mejor ensayo para la determinación cualitativa del VPH por PCR en Tiempo Real.

Los resultados demuestran que el método seleccionado presenta mayores ventajas en el diagnóstico molecular de VPH en comparación con la PCR punto final con los oligonucleótidos CP, y más aún con el diagnóstico citológico.

X. BIBLIOGRAFIA

1. Mendoza G other I, Ortiz E, Rocha L, Rivas C, Esparza E, Olmos J. Cervical cancer stem cells and eading factors associated with cervical cancer development. *Oncology Letters*. 2019;3423-3432.
2. Lizano M, Carrillo A, Contreras A. Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis. *Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM*. 2009; 4:205-207.
- 3.Sawaya GF, Huchko MJ. Detección de cáncer de cuello uterino. *Elsevier*. 2017;101(4):743-753.
4. Sanabria JG, Fernández ZC, Cruz IC, Oriolo L, Llanuch L. El cáncer cervicouterino y las lesiones precursoras: revisión bibliográfica. *Ciencias Médicas*. 2011;15 (4):295-319.
5. Vargas-Hernández V, Vargas-Aguilar V, Tovar-Rodríguez J. Detección primaria del cáncer cervicouterino. *Cirugía y Cirujanos*. 2015;83(5):448-453.
6. Llanes A, Torres I, Gómez C, Ochoa D. El cáncer cervicouterino, enemigo número uno de la mujer. *Revista Electrónica Medicina, Salud y Sociedad*. 2011;1(3).
7. Campero L, Atienzo EE, Marín E, De la Vara-Salazar E, Pelcastre-Villafuerte B, González, G. Detección temprana de cáncer de mama y cervicouterino en localidades con concentración de población indígena en Morelos. *Salud Pública de México*. 2014;56:511-518.
8. Ehrenzweig Y, Marván ML, Acosta EA. Conocimientos sobre la prevención del cáncer cervicouterino, locus de control y realización del Papanicolaou. *Psicología y Salud*. 2013; 23(2):161-169.
9. Reynales J. Infección por virus del papiloma humano y cáncer de cuello uterino. *Medicina*. 2012;34(4):324
10. Ochoa F, Guarneros DB, Velazco MT. Infección por virus del papiloma humano en mujeres y su prevención. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 2015;14(13):157-163.
11. Fuente D, Guzmán S, Barboza O, González RA. Biología del virus del papiloma humano y técnicas de diagnóstico. *Medicina Universitaria*. 2010;12(49):231-238.

12. Sanabria Negrín JG. Virus del papiloma humano. Rev Ciencias Médicas. 2009; 13(4):168-187.
13. Grillo CF, Martínez MY, Morales B. Virus del papiloma humano: aspectos moleculares y cáncer de cérvix. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. 2008;59(4):310-315.
14. Diestro MD, Serrano M, Gómez F. Cáncer de cuello uterino. Estado actual de las vacunas frente al virus del papiloma humano. Oncología. 2007;30(2):18.
15. Mazarico E. Relación existente entre la infección por los diferentes genotipos del virus del papiloma humano y la presencia de patología premaligna y maligna del cuello uterino. Gynecology Oncology. 2012;125:181-185.
16. Puig LM, Torné A. Historia natural de la infección por VPH. Asociación Española de Pediatría. 2008;9:75-84.
17. Picconi MA. Detección de virus papiloma humano en la prevención del cáncer cérvico-uterino. Medicina. 2013;73:585-596.
18. Rivera R, Delgado J, Painel V, Barrero R, Larraín A. Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical. Rev Chil Obstet Ginecol. 2006;71(2):135-140.
19. Mateos Lindemann ML, Pérez-Castro S, Pérez-Gracia MT, Rodríguez-Iglesias M. Diagnóstico microbiológico de la infección por el virus del papiloma humano. Mateos Lindemann ML (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2016.
20. López-Saavedra A, Lizano-Soberón M. Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: la historia que no termina. Cancerología. 2006;1:31-55.
21. Zaldívar G, Larrea L, Martín F, Sosa CF, Morales JA, Lloret M, Román M, Vega G. Cáncer cervicouterino y virus del papiloma humano. Rev Chil Obstet Ginecol. 2012;77(4):315-32.
22. Sanjosé Llonguerás S, García García AM. Virus del papiloma humano y cáncer: epidemiología y prevención. Cuarta Monografía de la Sociedad Española de Epidemiología. 2006;(4):33-34.

23. Puig LM, Torné A. Historia natural de la infección por VPH. Asociación Española de Pediatría. 2008;9:75-84.
24. Hernández L, Padilla S, Quintero ML. Factores de riesgo en adolescentes para contraer el virus del papiloma Humano. Revista Digital Universitaria. 2012;13(9):1067-6079.
25. Ortiz R, Uribe CJ, Díaz LA, Dangond YR. Factores de riesgo para cáncer de cuello uterino. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. 2004;55 (2):146-160.
26. Alfaro A, Fournier M. Virus del papiloma humano. Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXX. 2013;(606):211-217.
27. Pett M, Herdman MT, Palmer RD, Yeo GS, Shivji MK, Stanley MA, Coleman N. Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(10):3822-3827.
28. Espinosa R, Arreola RL, Velázquez N, Rodríguez ER. Métodos de detección oportuna del cáncer cervicouterino. Gaceta Mexicana de Oncología. 2014;13(4):48-52.
29. Varela Martinez S. Citología cervical. Rev Med Hondur. 2005;73:131-136.
30. Rodríguez O, Pichardo R, Escamilla G, Hernández M. Estudio de la patología citológica del cérvix. Perinatol Reprod Hum. 2009;23(1):12-17.
31. McCrory DC, *et al.* Evaluation of Cervical Cytology. Evid Rep Technol Assess. 1999;(5):1-6.
32. González A. factores inmunológicos y genéticos de la infección por el virus del papiloma humano en la neoplasia cervical intraepitelial: estudio de poblaciones linfocitarias y polimorfismos genéticos asociados a inflamación. Universidad de Granada. 2010.
33. Manzano-Merino J, Jiménez-Lima R, Cruz-Gregorio A. Biología molecular para el diagnóstico del cáncer cervicouterino. Gaceta Mexicana de Oncología. 2014;13(4):18-24.

34. Organización Panamericana de la Salud. Incorporación de la prueba del virus del papiloma humano en programas de prevención de cáncer cervicouterino. Manual para gerentes de programas de salud. Washington, DC;OPS, 2016.
35. Gutiérrez Rojo R. Utilidad de las técnicas moleculares de detección de VPH en el control y prevención del cáncer cervicouterino. Archivos Médicos de Actualización del Tracto Genital Inferior. 2011;5:16-23.
36. Zertuche JG, Salazar M, Peña AE, Vera D. Marcadores inmunohistoquímicos para virus de papiloma humano. Revisión sistemática. Rev Sanid Mili Mex. 2013;67(5):205-213.
37. Williamson D, *et al.* Distribution of HPV genotypes in women with cervical cancer in Auckland, New Zealand; a review of 50 specimens between 2000-2006. Australian and New Zealand. Journal of Obstetrics and Gynaecol. 2010:67-70.
38. Trevisan A, *et al.* Human papillomavirus type 16 viral load measurement as a predictor of infection clearance. Journal of General Virology. 2013;94(8):1850-1857.
39. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. Journal of Clinical Pathology. 2002;55(4):244-265.
40. Walboomers JM, *et al.* Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology*. 1999;189(1):12-19.
41. Gravitt. PE, *et al.* Improved Amplification of genital Human Papillomaviruses. Journal of Clinical Microbiology. 2000;38(1):357-361.
42. Abdullah A, *et al.* Molecular diagnosis and phylogenetic analysis of human papillomavirus type-16 from suspected patients in Pakistan. Infectious Agents and Cancer. 2016;11:1.
43. Jiang HL, Zhu HH, Zhou LF, Chen F, Chen Z. Genotyping of human papillomavirus in cervical lesions by L1 consensus PCR and the Luminex xMAP system. Journal Medical Microbiology. 2006;55(6):715-720.
44. Ying H, *et al.* High-risk HPV nucleic acid detection kit-the careHPVtest -a new detection method for screening. Scientific Reports. 2014;4:4704.

45. Lewis MJ. Situational analysis of cervical cancer in Latin America and the Caribbean. Pan American Health Organization/World Health Organization (OPS/OMS). 2004:1-33.
46. Linaldi-Yépez F, Hernández-Cruz L, Apresa-García T, Hernández-Hernández DM, Martínez-Torres J. Indicadores de calidad en la detección oportuna de cáncer cervicouterino en unidades de primer nivel de atención. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2010;48(3):243-252.
47. de Villiers EM. Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 1994;186:1-12.
48. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human Papillomavirus molecular biology and disease association. *Medical Virology*. 2016;25(Suppl 1):2-23.
49. Carrilho C, *et al.* Human papillomaviruses in intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the conjunctiva: a study from Mozambique. *National Institutes of Health*. 2013;22(6):566-568.
50. Jacobs MV, de Roda Husman AM, van de Brule DJ, Snijders PJ, Walboomers JM. Group-specific differentiation between high-and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *Journal Clinical Microbiology*. 1995;33(4):901-905.
51. Hegde D, Shetty H, Shetty PK, Rai S. Diagnostic value of acetic acid comparing with conventional Pap smear in the detection of colposcopic biopsy-proved CIN. *J Cancer Res Ther* 2011;7(4):454-458.
52. Albert S, Oguntayo O, Samaila M. Comparative study of visual inspection of the cervix using acetic acid (VIA) and Papanicolaou (Pap) smears for cervical cancer screening. *Ecancermedicalscience*. 2012;6:262.
53. Pretorius RG, Belinson JL. Colposcopy. *Minerva Ginecol*. 2012;64(2):173-180.
54. Guerrero E, *et al.* Comparison of ViraPap, Southern hybridization, and polymerase chain reaction methods for human papillomavirus identification in an epidemiological investigation of cervical cancer. *J Clin Microbiol* 1992;30(11):2951-2959.

55. Poljak M, Fujs K, Seme K, Kocjan BJ and Vrtacnik-Bokal E. Retrospective and prospective evaluation of the Amplicor HPV test for detection of 13 high-risk human papillomavirus genotypes on 862 clinical samples. *Acta Dermatovenerol. Alp. Panonica Adriat.* 2005;14:147–152.
56. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97:1066-1071.
57. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005;14:1157-1164.
58. Mendez F, *et al.* Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines. *J Infect Dis.* 2005;192:1158-1165.
59. Johnson LR, *et al.* A comparison of two methods to determine the presence of high-risk HPV cervical infections. *Am J Clin Path* 2008;130(3):401-408.
60. Poljak M, Cuzick J, Kocjan BJ, Iftner T, Dillner J, Arbyn M. Nucleic acid tests for the detection of alpha human papillomaviruses. *Vaccine* 2012;30(Suppl 5):F100-106.
61. Cox JT. History of the use of HPV testing in cervical screening and in the management of abnormal cervical screening results. *J Clin Virol* 2009;45(Suppl. 1):S3-12.
62. Stoler MH, *et al.* APTIMA HPV assay performance in women with atypical squamous cells of undetermined significance cytology results. *Am J Obstet Gynecol* 2013;208(2):144.e1-8.
63. Abreu AL, Souza RP, Gimenes F, Consolaro MEL. A review of methods for detection of human papillomavirus infection. *Virology* 2012;9:262.
64. Huang Y, Huang MN, Li N, Li X-G, Li N, Wu L-Y. Association between human papillomavirus DNA load and development of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2008;18(4):755-760.

65. Cuzick J, *et al.* New technologies and procedures for cervical cancer screening. *Vaccine* 2012;Suppl 5:F107-116.
66. Cuzick J, *et al.* Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population. *Br J Cancer*. 2013;108(4):908-913.
67. Szarewski A, *et al.* Comparison of seven tests for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears: The Predictors 2 study. *J Clin Microbiol*. 2012;50(6):1867-1873.
68. Halfon P, *et al.* Evaluation of the clinical performance of the Abbott RealTime High-Risk HPV for carcinogenic HPV detection. *J Clin Virol*. 2010;48(4):246-250.
69. Wong OGW, Lo CK, Szeto E, Cheung ANY. Efficacy of Abbott Real Time High Risk HPV test in evaluation of atypical squamous cells of undetermined significance from an Asian screening population. *J Clin Virol*. 2011;51(2):136-138.
70. Bernal-Martínez SB, *et al.* Comparison of the Cobas 4800 Human Papillomavirus test against a combination of the Amplicor Human Papillomavirus and the Linear Array tests for detection of HPV types 16 and 18 in cervical samples. *J Virol Methods*. 2012;180:7-10.
71. Globocan. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 IARC. 2012. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>. Accessed 05-13-2015.
72. Kane MA. Preventing cancer with vaccines: progress in the global control of cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012;5:24-29.
73. Murillo R, *et al.* Cervical cancer screening programs in Latin America and the Caribbean. *Vaccine* 2008;26(Suppl 11):L37-48.