

I. INTRODUCCIÓN

El virus del Papiloma Humano (VPH) es el virus que está más frecuentemente relacionado con el cáncer cervical; este virus que principalmente se transmite por vía sexual infecta principalmente a personas jóvenes, durante el inicio de su vida sexual, siendo el varón considerado como portador y la mujer quien más fácilmente desarrolla lesiones. Más de 100 tipos VPH han sido caracterizados molecularmente, donde aproximadamente 40 de ellos son capaces de infectar el tracto genital, causando desde verrugas genitales conocidas como condilomas (VPH de bajo riesgo); hasta el crecimiento de células anormales, que puede resultar en cáncer (VPH de alto riesgo).¹

Este cáncer está caracterizado por la proliferación anormal y el crecimiento descontrolado de las células del exocervix y endocervix. El cáncer de cuello uterino (CaCu) es una de las enfermedades más frecuentes y una de las que ocasiona más muertes de mujeres adultas en nuestro país. Todas las mujeres están en riesgo, sobre todo aquellas que viven en condiciones de pobreza y exclusión, porque además de carecer o tener restringido el acceso a los servicios de prevención y tratamiento, conviven con otros factores de riesgo por sus propias condiciones de vida.

Los programas de prevención de CaCu en general incluyen la prevención secundaria, basada en la técnica citológica como el Papanicolaou, seguida por un manejo efectivo de las lesiones pre-neoplásicas. Sin embargo, estos programas en países como Bolivia, no han logrado un impacto considerable sobre su incidencia ni sobre las tasas de mortalidad de CaCu. La citología (PAP) del cuello uterino es un examen de detección temprana, no es eficaz dada su baja sensibilidad y su gran margen de error; lo que explica la alta mortalidad femenina en nuestro país. Este método es muy utilizado ya que su costo es bajo, pero exige un buen control de calidad durante el muestreo, la preparación de las placas y la interpretación de los resultados lo que no siempre es eficiente en países como Bolivia.

En otros países la utilización de técnicas como la colposcopia y sobre todo las técnicas moleculares juntamente con la citología ha mejorado considerablemente la detección precoz de CaCu. La aplicación de técnicas moleculares para la detección precoz de CaCu mediante la amplificación del ADN de VPH exige la buena conservación de muestras cervicales dado que la extracción del ADN viral se realiza a partir de células infectadas.

El Easy Fix y otras soluciones similares son corrientemente utilizados con estos fines en países donde las técnicas moleculares han sido introducidas. Estas soluciones conservan las células cervicales en buen estado por tiempos prolongados, sin embargo, las dificultades que presentan estas soluciones son su costo y su dificultad en el transporte. El objetivo de este trabajo es proponer o sugerir un método más simple de muestreo y de transporte de muestras cervicales que preserve en buenas condiciones el ADN viral del VPH. El papel filtro FTA y láminas de PAP podría ser una buena alternativa ya que sería fácilmente aplicable en regiones alejadas, lo que permitiría aplicar las técnicas moleculares para el diagnóstico precoz del CaCu en nuestro país.

1.2 Planteamiento del problema y justificación

Uno de los principales problemas para el control de Cáncer Cervical (CC) en Bolivia es el diagnóstico precoz de esta enfermedad. La aplicación de técnicas moleculares basadas en la detección de ADN del VPH junto con el Papanicolaou es una buena alternativa que permitiría mejorar el diagnóstico de CC. Sin embargo, el empleo de estas técnicas requiere métodos de recolección y transporte eficaces y que preserven bien el ADN viral. Normalmente estas células son tomadas y preservadas en medios líquidos, sin embargo estos son caros y de difícil obtención en países como Bolivia. Una alternativa sencilla y de bajo costo es la obtención de células a partir de frotis de lámina o la toma de muestra en papel filtro. Por lo tanto la comparación y validación de estos métodos es importante para poder aplicarlos rutinariamente, especialmente para muestreos de pacientes que viven en zonas alejadas.

1.3 Hipótesis

La obtención del ADN viral de VPH a partir de muestras depositadas, conservadas y transportadas en papel filtro Whatman FTA (tarjetas FTA) y el Frotis en Láminas presentan las mismas condiciones de calidad, reproducibilidad y sensibilidad para la detección de VPH que el método Easy Fix.

II. OBJETIVOS

2.1.- Objetivo General

- Comparar la eficiencia en la obtención y preservación de ADN del virus del papiloma humano a partir de células cervicales recolectadas y transportadas en papel Whatman FTA y Frotis en láminas, en mujeres que acuden al Hospital Materno Infantil Germán Urquidi de Cochabamba.

2.2.- Objetivos Específicos

- Estandarizar la técnica de obtención de ADN humano y ADN viral a partir de muestras de células cervicales recolectadas y transportadas en papel Whatman FTA y Frotis en láminas.
- Evaluar la capacidad de conservación de ADN humano provenientes de células cervicales obtenidas a partir de frotis en láminas y papel Whatman FTA, mediante la amplificación del gen de la β - globina.
- Evaluar la capacidad de conservación del ADN viral proveniente de células cervicales obtenidas a partir de frotis en láminas y papel Whatman FTA utilizando los primers PGMY 09/11.
- Identificar el medio de recolección y transporte de muestras de cepillado cervical más aconsejable para la detección del ADN de VPH.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades del Cáncer de Cuello de Útero

El cáncer es una enfermedad caracterizada por el crecimiento desordenado y explosivo de las células de los tejidos en el cuerpo humano, dando como resultado un aumento de volumen del órgano afectado. Una de las teorías más aceptadas es que la célula cancerosa es el resultado de acumulación de una serie de alteraciones de un grupo concreto de genes en el ADN, así como la expresión de oncogenes y genes supresores que codifican proteínas cruciales en las vías de señalización que controlan los procesos de proliferación celular. Como consecuencia de estas anomalías se desarrolla una célula transformada, la cual tiene la capacidad de proliferar, invadir y producir metástasis.¹⁰

Las células cancerosas contradicen las reglas básicas del comportamiento de las células de los organismos pluricelulares. Tanto ellas, como su progenie, se caracterizan por dos propiedades hereditarias. En primer lugar, se reproducen a pesar de todas las restricciones normales. Por otro lado, invaden y colonizan territorios reservados para otras células. La combinación de estas dos características es lo que hace este tipo de cáncer sea especialmente peligroso⁸.

De los diferentes tipos de cáncer que afectan a las mujeres, el Cáncer del Cuello Uterino (CaCu) es una de las enfermedades más frecuentes. Esta patología aparece en la unión escamo celular entre el epitelio columnar del endocervix y el epitelio escamoso de la exocervix, son en estas áreas donde ocurren los cambios metaplasicos¹³.

El factor de riesgo más común del CaCu es la exposición a ciertas variedades del Virus de Papiloma Humano (VPH), este virus se transmite generalmente por transmisión sexual y es asintomático en la mayoría de los casos. Dada la característica de latencia del VPH, los cambios metaplasicos en el cérvix, pueden ocurrir antes de que la infección se detecte.³²

Esta enfermedad es muy frecuente sobre todo en países como Bolivia (alrededor del 86% de los casos ocurren en los países en desarrollo), representa el 13% de los

cánceres femeninos. Solo los tipos de VPH 16 y 18 son responsables de aproximadamente el 70% de todos los casos de cáncer cervical en todo el mundo³⁹.

3.1.2 Factores de riesgo del Cáncer del Cuello de Útero

Se denomina factor de riesgo a cualquier factor asociado con el posible desarrollo de una enfermedad, aunque no sea suficiente para causarla por sí solo. Para el caso particular del CaCu, la infección por el virus del papiloma humano es el principal factor de riesgo asociado con el desarrollo de estos tumores (99.7% de las mujeres diagnosticadas con VPH)³⁵, sin embargo esta enfermedad puede verse antecedida por otros factores que están relacionados básicamente con la conducta de las pacientes y sucesos ambientales y no por factores genéticos. A continuación se mencionan algunos de ellos:

- Inicio de relaciones sexuales a edad muy temprana
- Tener varias parejas sexuales (promiscuidad)
- Malos hábitos higiénicos.
- Infecciones genitales frecuentes.
- Infección cervical por el Virus del Papiloma Humano
- Tabaquismo
- Deficiencias nutricionales (ácido fólico y vitamina A)
- Haber tenido muchos embarazos (multiparidad).
- Tener antecedentes de diversas enfermedades venéreas (sífilis, gonorrea, tricomoniasis, etc.)
- Nunca haber acudido a un estudio citopatológico (Papanicolaou).

Distintos investigadores consideran que la supervivencia de mujeres con cáncer cervical depende de las características del tumor, la condición de la paciente, el esquema de tratamiento, la presencia y el tipo de VPH y el grado de desarrollo de la lesión en el momento de la detección.

Son muchos los elementos involucrados en el establecimiento de la infección por VPH y su posible progresión a lesiones intra-epiteliales de bajo y alto grado, así

como el desarrollo de cáncer. El conocimiento integrado de todos estos factores o elementos que involucran al paciente como entidad social y biológica, al virus y a los posibles co-factores es fundamental para la implementación de programas de prevención (educativos y profilácticos) y para el óptimo manejo de los recursos disponibles en el tratamiento y seguimiento de los distintos niveles de esta patología. A pesar de que se considere al VPH como la causa necesaria de virtualmente todos los casos de cáncer de cérvix, no todas las mujeres infectadas por VPH de alto riesgo desarrollan Lesión Intra-epitelial Escamosa de Alto Riesgo (HSIL o carcinoma invasor). De hecho, es bien conocida clínica y epidemiológicamente que la gran mayoría de mujeres infectadas resuelven espontáneamente su infección siendo sólo una pequeña fracción las que experimentan una persistencia frecuentemente sub-clínica que las pondrá en un riesgo elevado de progresión neoplásica. Por lo tanto, a pesar de ser la causa necesaria del cáncer de cérvix, la infección por VPH no es de ninguna manera una causa suficiente para el desarrollo de este tumor. Consecuentemente, si sólo algunas mujeres infectadas progresan a HSIL/cáncer probablemente existen otros factores o co-factores - que interaccionando con el VPH modulan el riesgo de progresión ⁷.

A pesar de su potencial oncogénico, la infección por VPH es un fenómeno transitorio que puede revertirse espontáneamente o permanecer en estado latente en el 80 % de casos detectados, por lo que se le considera como una causa necesaria pero insuficiente para el desarrollo de malignidad ³¹.

3.2 Epidemiología del Cáncer de Cuello de Útero

El cáncer invasor del cuello del útero (CaCu) es un problema de salud pública sobre todo en países sub-desarrollados. Es el segundo cáncer más común entre las mujeres en todo el mundo, se estima que ha habido para el 2008, 529.409 nuevos casos y 274.883 muertes ³⁹. Durante los últimos años, la incidencia y mortalidad por cáncer de cérvix en los Estados Unidos de América (EUA) y otros países desarrollados han disminuido notablemente ^{29,30}

Bolivia tiene la tasas de incidencia y de mortalidad por CaCu más altas de América) 56,55 y 26,3 por cada 100 mil mujeres respectivamente (cuadro 1)⁸. Aunque en nuestro país se tiene una unidad establecida dentro del Ministerio de Salud y Deportes para crear, administrar y supervisar programas nacionales para la prevención y el tratamiento del cáncer cervico-uterino, en coordinación con las autoridades sanitarias en cada uno de los departamentos del país, estas, no están debidamente vinculados entre sí. Los programas no cuentan con recursos humanos suficientemente capacitados, ni con recursos económicos necesarios para llevar adelante las estrategias destinadas a lograr que el tamizaje del cáncer cervico uterino alcance la cobertura ideal de 80%, que es la meta establecida internacionalmente⁸. Una buena parte de la población carece de información sobre los servicios para la prevención y el tratamiento de lesiones pre-cancerosas, o no puede llegar a estos servicios con facilidad. Los proveedores de atención sanitaria en el sector público calculan que de 50 a 80 por ciento de las mujeres sometidas al tamizaje no regresan a su seguimiento por qué no hay ningún sistema que garantice un seguimiento adecuado con fines de diagnóstico o tratamiento. Muchos prestadores de atención de salud desconocen que el frotis de Papanicolaou se usa para detectar lesiones pre-cancerosas. Por añadidura, los servicios de diagnóstico y tratamiento no siempre son suficientes o son poco accesibles ²⁷.

Tabla 1: Incidencia y Mortalidad por CaCu en países de América

País o región	2000		2002		Tasas ajustadas (x 100,000 mujeres)	
	Casos Nuevos	Difunciones	Casos Nuevos	Difunciones	Incidencia	Mortalidad
Haiti	2.428	1.326	2.774	1.484	90.6	50.8
Bolivia	1.807	661	1.831	987	56.55	26.3
Nicaragua	997	392	809	354	54.15	24.2
Paraguay	768	281	1.131	513	7.15	20.95
Peru	4.101	1.575	5.400	2.663	44.05	20.2
Ecuador	2.231	892	1.978	1.064	41.45	19.85
El salvador	1.041	387	1.213	609	43.1	17
Guatemala	1.432	566	1.153	628	35.1	17
R. Dominic	1.290	495	1.032	562	34.6	16.55
Venezuela	3.904	1.454	3.845	0.705	37.15	16
Colombia	5.901	2.339	6.815	3.296	34.65	15.95
Mexico	16.448	6.650	12.516	5.777	35	15.6
Panamá	389	158	375	166	29.7	13
Am. del sur	48.999	18.725	48.293	21.383	29.75	12.45
Brasil	24.445	8.815	19.603	8.286	27.35	10.9
Chile	2.321	860	2.163	931	27.5	10.8
Cuba	1.586	730	1.346	567	22	9.45
Argentina	2.953	1.585	4.924	1.679	18.7	7.7
Uruguay	307	163	392	162	16.3	7.3
Canadá	1.608	650	1.502	581	7.95	2.65

Fuente: Plan Nacional de Prevención Control y Seguimiento de Cáncer de Cuello Uterino 2009-2015

La situación actual, de incidencia y mortalidad por cáncer de cuello uterino en Bolivia es grave y alarmante, sobre todo si se toma en cuenta que esta patología se puede prevenir y detectar precozmente de manera eficaz y con medios relativamente económicos, más aun cuando el Estado garantiza en el Seguro Universal de Salud, la atención de estas patología hasta el estadio de carcinoma in situ.⁸

3.3 Virus del Papiloma Humano (VPH)

Los VPHs son miembros la familia Papovaviridae, el genoma de estos virus está formado de una cadena doble de ADN circular de aproximadamente 7900 pb, este ADN está asociada con histonas y tiene un peso molecular cercano a 65×10^6 ⁽²⁾. El virión mide de 53 a 55 nm, tiene una cápside icosaedrica simétrica compuesta de 72 capsomeros la cual está constituida de dos proteínas estructurales: L1 y L2, este virus no poseen envoltura¹² (figura 1).

Su estructura genómica esquematizada en la (figura 2) , esta compartida por los más de 100 tipos secuenciados hasta la fecha y consta de varios genes llamados Regiones de lectura abierta “Open Reading Frames en inglés (ORF)” de dos tipos diferentes: genes de expresión temprana o “early” (E1-E8), cuya expresión se traduce en proteínas implicadas en la regulación y replicación viral, y 2 genes de expresión tardía o “late” (L1, L2) cuya expresión genera las proteínas para el ensamblaje de la cubierta viral y la cápside. Una región de control, denominada “Long Control Región” (LCR), será la encargada de controlar la expresión de los genes tempranos E6 y E7⁷.

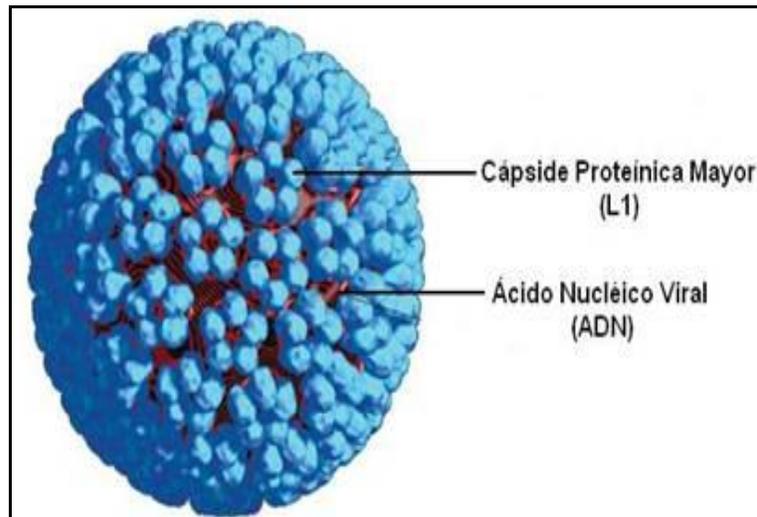


Figura 1 Modelo tridimensional del Virus Papiloma Humano
Fuente: http://dimygen.webcindario.com/31_clip_image004.jpg

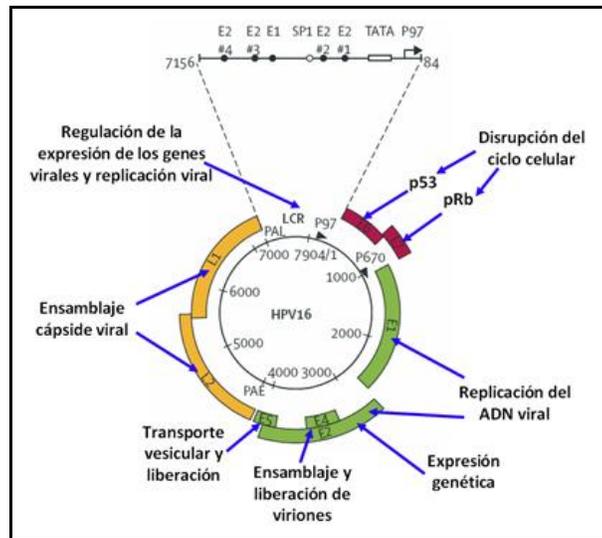


Figura 2 Estructura esquematizada del VPH 16

Fuente: Autores: Schiffman M, Castle PE, Jerónimo J, Rodríguez AC, Wacholder S. Lancet. 2007 Sep 8; 370(9590):890-907; adaptada de Human papillomavirus and cervical cáncer.

Mientras que los genes de expresión temprana difieren notablemente en su secuencia entre los diferentes tipos de VPHs, los genes de expresión tardía presentan notables similitudes entre ellos. Esta peculiaridad convertirá a estos genes, especialmente a L1, en la diana principal de la detección de DNAs virales por métodos “consenso” al contrario de la detección “tipo específica” que utilizará genes con alta variabilidad intertipo como E6 y E7⁷.

Los Papiloma Virus Humanos, al igual que otros virus, aprovechan la maquinaria celular para replicarse; son epitelio tróficos y una vez que alcanzan las células basales pueden permanecer en forma episomal, en estado latente, o bien abandonar esa latencia y aprovechar la diferenciación celular propia del epitelio cervical. De este modo, paralelamente a la maduración del epitelio cervical, los VPHs expresan sus genes de forma secuencial; en primer lugar los genes tempranos (E1- E8), en las capas basales y posteriormente, en capas superficiales del epitelio más diferenciado, expresan sus proteínas tardías (L1 y L2) que forman la cápside y permiten el ensamblaje de nuevas partículas virales que repetirán el ciclo. En determinadas circunstancias fisiológicas de “permisividad inmunológica” y tras un período de persistencia de la infección, generalmente largo, las partículas de DNA viral que se encuentran en forma episomal, sufren un proceso de integración dentro del genoma

celular y con ello una serie de acontecimientos que conducen a un proceso de bloqueo de proteínas con funciones importantes en el ciclo celular (p53 y Rb) y, como consecuencia, alteraciones en el crecimiento normal y diferenciación del epitelio cervical seguidas de un acumulo de errores genéticos (clastogénesis) que son la base de la transformación tumoral (tabla 1).⁷

Tabla 2: Regiones de Lectura Abierta (ORF) del genoma del VPH

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 inestabilidad genómica. Interracción con dominios proteicos PDZ.
E 7	Degradación pRb. Inestabilidad genómica.
L1	Proteína mayor cápside viral.
L2	Proteína menor cápside viral. Recluta genoma viral para organizarlo en la capsida

Fuente: Molecular aspects of human papillomavirus and cervical cancer, Carlos Fernando Grillo-Ardila, M.D.*, Mercy Yolima Martínez-Velásquez, M.D. Buenaventura Morales-López, M.D. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología Vol. 59 No. 4 • 2008 • (310-315)

3.3.1 Clasificación del Virus del Papiloma Humano

Se han identificado de 200 tipos del Virus de Papiloma Humano y de ellos han derivado varias clasificaciones de acuerdo a la especie, origen y al grado de homología de las secuencias de nucleótidos en regiones específicas del genoma.

Por definición, las secuencias de los genes E6, E7, L1 y el marco de lectura de un nuevo tipo de VPH no deben presentar una homología por arriba del 90% a las secuencias de los tipos de VPH conocidos, algunas variantes naturales tienen diversas características biológicas y bioquímicas importantes en riesgo de cáncer³³. A su vez, se tiene considerados tres grupos clínico-patológicos: cutáneo, mucoso y de la epidermo displasia verruciforme.

Son alrededor de 30 virus que infectan determinantemente las mucosas genitales y se clasifican en dos grandes grupos según su potencial riesgo de progresión a cáncer.

3.3.1.1 VPH Alto Riesgo

Los Virus de Papiloma Humano de alto riesgo son los que se encuentran con mayor frecuencia asociados en los casos de cáncer de cuello uterino. Estos virus oncogénicos causan crecimientos que normalmente parecen planos y son casi invisibles, comparados con las verrugas causadas por los VPH-6 y VPH-11^{11,32}. Sin embargo, se encuentran en todo el espectro de las lesiones intra-epiteliales e invasoras, tanto el escamoso como el glandular. Este grupo está constituido por lo menos de 15 tipos, que incluyen VPH -16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 70². Los VPH tipo 16 y 18 son considerados particularmente carcinógenos. La asociación entre la infección con estos virus y el desarrollo del CaCu ha sido claramente demostrada²⁸.

3.3.1.2 VPH Bajo Riesgo

Virus de Papiloma Humano de bajo riesgo o no oncogénico se les llama aquellos virus cuyo riesgo de provocar cáncer es bajo. Producen infecciones en piel, en las mucosas del tracto ano genital, oral (boca, garganta) y respiratorio. En la piel las lesiones más frecuentes son las verrugas cutáneas también llamadas verrugas vulgares y las verrugas plantares, que son lesiones en las plantas de los pies que a menudo son dolorosas. Las lesiones ano genitales incluyen a las verrugas genitales (condiloma acuminado, cresta de gallo) que son formaciones escamosas con aspecto de coliflor que aparecen en las zonas húmedas de los genitales. En este grupo los tipos más comunes de VPH son el 6, 11, 40, 42, 53, 54 y 57².

Los tipos de VPH de bajo riesgo pueden causar cambios en el cuello del útero de una mujer. Estos cambios no conducen al cáncer, no son perjudiciales y desaparecen con el tiempo. Solo rara vez se asocian con una lesión escamosa intraepitelial de alto grado o un carcinoma invasor.

3.4 Métodos de Diagnóstico y Control de Cáncer Cervical

Las técnicas diagnóstico para la detección del virus pueden ser; morfológicas (citología, colposcopia e histopatología, incluso microscopia electrónica), inmunohistoquímicas para la detección del antígeno (Ag) viral en la lesión, y técnicas basadas en la detección del ADN viral mediante hibridación o amplificación.

Aunque no existe un método ideal para el diagnóstico de la infección por VPH y su validez depende de la forma de infección, este debería ser rápido, económico, sensible y específico, aplicable a muestras no invasivas y capaz de tipificar el VPH implicado en la lesión ⁴⁵.

3.4.1 Papanicolaou

La citología de Papanicolaou convencional consiste en la toma, observación e interpretación de una muestra de células del cérvix. Esta prueba detecta cambios inflamatorios, infecciosos o la presencia de células anormales y neoplásicas en la muestra. Las células son tomadas utilizando un palillo de madera con un algodón en la punta, cytobrush o espátula de madera (Ayre) (Figura 3), los cuales se frota sobre la superficie del cérvix y arrastrando una muestra de células, las cuales son colocadas sobre una laminilla y mandadas al laboratorio de Patología para su tinción y análisis ²³.

El PAP es una herramienta muy útil, por su bajo costo, fácil realización y amplia difusión, no obstante tiene poca reproducibilidad, sensibilidad y una especificidad variable dependiente de la experiencia del personal que la realiza (el PAP presenta un significativo porcentaje de falsos negativos que alcanza, dependiendo del laboratorio, hasta 20-30% de los frotis examinados). Como consecuencia, se estima que aproximadamente el 50 % de las infecciones VPH positivas pasan desapercibidas por PAP ²¹. Además, debe considerarse que la detección indirecta de VPH mediante estos exámenes, no permite la tipificación viral, importante información en el momento de categorizar subgrupos de pacientes desde una perspectiva clínica práctica.

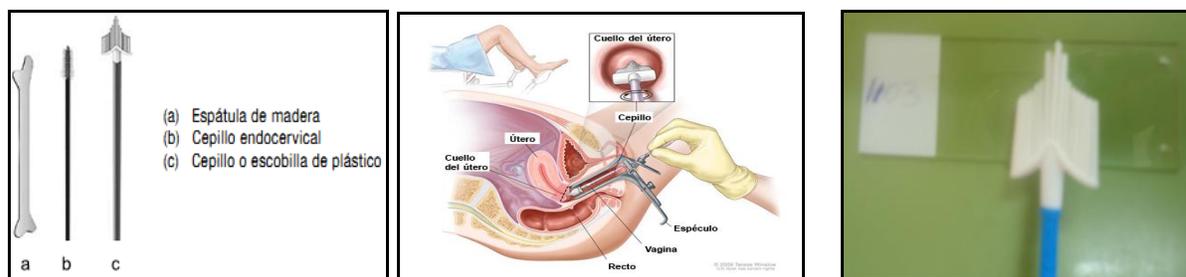


Figura 3: a) Tipos de cepillos b) Toma de muestra c) Extensión de cepillado

Fuente: a) Organización Mundial de la Salud Control integral del cáncer cervico uterino HP8 p: 121

b) <http://www.rho.org/aps/learn-screening.htm>

El sistema de clasificación más utilizada para los cambios morfológicos por PAP es el sistema Bethesda, que recoge la calidad de la muestra y establece categorías y sub-categorías según la presencia y el grado de las lesiones epiteliales.

3.4.2 Colposcopia

La colposcopia es un procedimiento médico en el cual se utiliza un estéreo-microscopio (llamado colposcópico) para observar y examinar vía vaginal detenidamente el cuello uterino (la abertura del útero o matriz) figura 4. El colposcópico magnifica o amplía la imagen de la parte exterior del cuello uterino.

La colposcopia detecta las lesiones sub-clínicas como epitelios blancos, de morfología y extensión variables, que aparecen tras la aplicación de ácido acético al 5%. Ante cualquier evidencia clínica o sospecha citológica de infección por VPH o lesión intra-epitelial en la mujer, dada la frecuente multicentricidad y multifocalidad de la infección, debe hacerse un examen colposcópico de todo el tracto genital inferior.

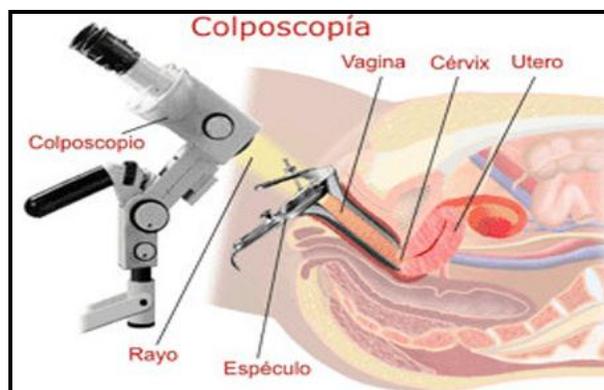


Figura 4: Realización de una colposcopia

Fuente: <http://gdtmujersomamfyc.wordpress.com/category/cervix-y-virus-del-papiloma-humano/>

Este método es útil para la extracción de muestras de tejido (biopsias) para efectuar estudios adicionales en caso de observar anomalías o signos de lesión. Los hallazgos anormales durante una colposcopia pueden ser: patrones anormales en los vasos sanguíneos, parches blanquecinos (visibles por la aplicación de ácido acético en la zona de la lesión IVAA, VILI) en el cuello uterino y áreas inflamadas, erosionadas o atróficas (tejido desgastado). Cualquiera de estas anomalías puede indicar cambios pre-cancerosos y cancerosos. Por su parte el examen de colposcopia tiene una alta sensibilidad, pero baja especificidad.³⁴

3.4.2.1 Inspección Visual Ácido Acético (IVAA)

La IVAA consiste en pincelar el cérvix con una torunda de algodón embebida en solución de ácido acético al 3 a 5% y realizar examen del cuello uterino con el ojo desnudo con iluminación de lámpara común por personal capacitado. El aspecto blanquecino del tejido puede indicar un proceso benigno o neoplásico.

El ácido acético produce una desnaturalización de las proteínas nucleares y deshidratación del citoplasma celular de manera reversible, lo que hace que los tejidos con relación núcleo: citoplasma más alta reflejen la luz blanca proyectada y aparezcan blancos. Este efecto puede observarse a simple vista, luego de un minuto posterior a su aplicación cuando se lo utiliza al 5%, mientras que si la concentración es del 3%, el tiempo que debe esperarse es de 2 minutos. La aparición de lesiones cervicales acetoblancas bien delimitadas, pueden corresponder a neoplasia cervical o sus precursores. Las células pre-cancerosas tienen diferente estructura e índices de absorción que las células normales, y se ponen temporalmente de color blanco al entrar en contacto con la solución⁴⁰.

Este método es sencillo, de bajo costo y fácil de aprender además requiere poca infraestructura, puede ser realizado por prestadores de salud que no necesariamente sean médicos, siempre que reciban suficiente capacitación y supervisión²². Su desventaja es que con poco adiestramiento y control de calidad puede haber resultados falsos positivos²⁰, como por ejemplo la presencia de epitelio metaplásico

inmaduro, que puede llevar a tratar a mujeres sin necesidad, este método puede ser menos preciso en mujeres post-menopáusicas.

3.4.2.2 Inspección Visual Con Yodo Lugol (VILI)

Al igual que la técnica IVAA, la VILI es la observación del cuello uterino con ojo desnudo, luego de la aplicación de solución de yodo lugol al 25%. Dicha solución, con avidéz por el glucógeno, tiñe de color caoba oscura el epitelio escamoso normal, lo que indica que la célula contiene glucógeno. La falta de tinción significa un estado no glucogenado, presuntamente patológico.

El epitelio cilíndrico no cambia de color, ya que no contiene glucógeno, pero puede cambiar débilmente; la metaplasia inmadura o incipiente y las lesiones inflamatorias tienen un contenido parcial de glucógeno, y al teñirse aparecen como áreas de captación dispersa y mal definida. Las lesiones precursoras y el cáncer invasor no captan el yodo, ya que carecen de glucógeno, y aparecen como áreas bien definidas, gruesas, de color amarillo mostaza o azafrán ⁴¹.

3.4.3 Anatomía Patológica (Biopsia)

Para efectuar una biopsia sólo se necesita una pequeña cantidad de tejido y a veces se necesita extraer una muestra de biopsia en forma de cono, más grande (conización). Toda lesión colposcopia sospechosa debe ser biopsiada (figura 5), básicamente las verrugas genitales en muy pocas ocasiones precisan una confirmación histológica, dado su escaso porcentaje de asociación con lesiones pre-neoplásicas. La biopsia a partir de la lesión sospechosa es una forma rutinaria y establecida de confirmar el diagnóstico histopatológico y permite un diagnóstico de gran precisión sobre el grado de lesión precursora o malignidad⁴⁵.

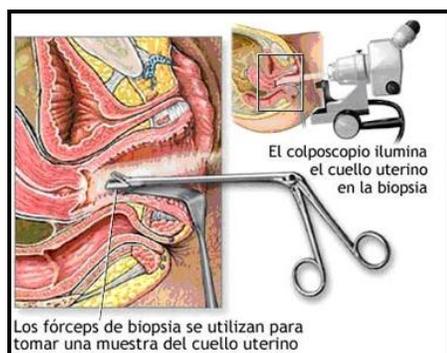


Figura 5: Realización de una Biopsia
Fuente: <http://www.tocogyn.com/técnicas-diagnosticas-del-VPH. asp>.

3.4.4 Inmuno histoquímica

La utilidad de la detección de antígenos de VPH por inmunohistoquímica sigue siendo algo controversial, ya que la mayoría de los patólogos piensa que la detección de VPH por inmunohistoquímica es específica pero relativamente de baja sensibilidad y que la identificación viral, así como de sus subtipos, es muy importante para determinar el riesgo potencial de progresión a cáncer cervical. Algunos especialistas peruanos han realizado investigaciones de detección de VPH por este método ³⁷.

En la actualidad, se puede utilizar el método clásico para la detección de anticuerpos anticapside, empleando anticuerpos policlonales frente a antígeno comunes de proteínas tardías. Este método no permite la diferenciación del tipo ni la detección de infecciones mixtas, frecuentes en CIN.

Los métodos inmunohistoquímicos también tiene como inconvenientes la baja sensibilidad (positivos solo en el 30-50% en condilomas, siendo el grado de positividad inverso al grado de CIN). Los anticuerpos policlonales solo tiñen células que expresan proteínas tardías, y no detectan infecciones latentes y probablemente tampoco la mayoría de infecciones sub-clínicas, por la escasa cantidad de antígeno presente en las células infectadas. No son utilidad como pre-dictores pronósticos de la enfermedad por su ausencia de correlación con la evolución clínica. La utilización de anticuerpos anti-proteínas de regiones codificadoras específicas podría paliar algunos de estos inconvenientes en el futuro próximo ⁴⁵.

3.5 Técnicas basadas en la detección del ADN viral

La utilización de la técnica de biología molecular contribuye a detectar la presencia del genoma viral, a partir de diferentes muestras obtenidas ya sea muestras citológicas, biopsias aun si la infección es oculta o el número de partículas virales es bajo.

3.5.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de polimerasa es un método de amplificación molecular que permite amplificar muy pequeñas cantidades del ADN objetivo en la muestra analizada. Tiene una elevada sensibilidad y es capaz de detectar hasta un mínimo de 10 copias de ADN viral entre 1 millón de células³⁶. La PCR para la amplificación de ADN de VPH usa primers o cebadores de consenso. Los más utilizados actualmente para la detección de ADN de VPH son PGMY09/11, GP5+/GP6+ y SPF10³⁶. Para realizar la técnica PCR es preciso disponer de laboratorio y personal especializado, dada la posibilidad de contaminación cruzada y de interpretación diagnóstica errónea si no se tiene el material y entrenamiento adecuados³⁶. Los primers PGMY09/11 fueron rediseñados a partir de los primers MY09/11 para aumentar la sensibilidad de la amplificación de todo el espectro de tipos de VPH, mediante el uso de las regiones del mismo primer de unión en el marco de lectura abierto L1⁵⁰. La heterogeneidad de la secuencia fue acomodado mediante el diseño de múltiples secuencias de cebadores que se combinaron; 5 oligonucleótidos (PGMY11) hacia delante y los complementarios (o reverso) compuesto de 13 oligonucleótidos (PGMY09), evitando así el uso de bases degeneradas que producen la síntesis de cebadores irreproducibles. El sistema PGMY09/11 parece ser significativamente más sensible que el sistema MY09/11⁵⁰.

3.5.2 Sistema del Híbrido de Captura (SHC)

En esta técnica, el ADN celular extraído y desnaturalizado se hibrida con ARN complementario. Posteriormente, las moléculas híbridas, ADN-ARN, son captadas por anticuerpos específicos situados en las paredes del tubo y marcados con fosfatasa alcalina, la cual reacciona produciendo una luminosidad determinada que expresa la presencia y carga de determinados tipos de VPH. Los resultados se expresan en unidades relativas de luz (RLU). Un RLU equivale a 1 pg./ml. La primera generación de captura de híbridos (HC-I) detectaba un rango razonable de tipos de VPH, de bajo y alto riesgo, pero no ofrecía buena sensibilidad y especificidad, y su manejo resultaba complicado. La segunda generación (HC-II) puede detectar un mayor espectro de tipos virales, presenta una sensibilidad analítica 10 veces mayor y es capaz de utilizarse en grandes programas de detección precoz ³⁸

3.5.3 Southern Blotting

Esta técnica se basa en tratar el ADN con enzimas de restricción y separar los fragmentos con electroforesis en un gel de agarosa. Para su realización se parte de DNA aislado del tejido en las mejores condiciones posibles. El ADN, tras cortarlo con enzimas de restricción, se desnaturaliza para obtener fragmentos de cadena sencilla que se transfieren del gel de agarosa a un filtro de nitrocelulosa sobre el cual quedan inmovilizados. Esta transferencia es necesaria para que pueda realizarse la reacción de hibridación. El ADN queda atrapado en la nitrocelulosa y entonces cuando se puede hibridar con la sonda radioactiva o colorimétrica. Cada secuencia complementaria da lugar a una banda marcada que adquiere una posición determinada por el tamaño del fragmento del ADN. La reacción se pueden marcar radioactivamente⁵².

3.5.4 Dot Blot

Otra variante de las técnicas de hibridación es el Dot blotting. Tiene la ventaja de que la transferencia del ADN al filtro o papel es muy eficiente por la acción del vacío facilitan dicha transferencia y adhesión al filtro. Por otra parte, permite ensayar rápidamente muchas secuencias clonadas por su homología con una sonda radioactiva. Los ADN clonados a probar se colocan uno al lado del otro sobre un filtro que se hibrida con una sonda de ARN marcada radioactivamente y que se corresponde a la secuencia problema. Si la secuencia esta representada en un clon particular, la mancha que indica ese clon se pone de manifiesto con la autorradiografía⁵².

3.5.5 Hibridacion In Situ (HIS)

La hibridación in situ consiste en desnaturalizar el DNA cromosómico por calor 95 °C y posteriormente añadir una solución que contiene la sonda con el ADN o RNA marcado, que hibridara con sus consecuencias complementarias. El marcado de las sondas se puede hacer por radioactividad con P³², S³⁵, o I¹²⁵ y posteriormente detectarse por autorradiografía. El marcado por biotina o digoxigenina se visualiza mediante una reacción colorimétrica⁵³.

3.5.6 INNO-LIPA

Las pruebas Linear Array (Roche) e INNO-LIPA consisten en la hibridación reversa de productos de amplificación obtenidos por PCR⁵⁵. El material de ADN biotinilado amplificado se desnaturaliza químicamente, y las hebras separadas se hibridan con sondas de oligonucleótidos específicos inmovilizadas en bandas paralelas sobre tiras basadas en membranas. Esto va seguido de una fase de lavado astringente a fin de eliminar cualquier material amplificado incorrectamente emparejado. Tras el lavado astringente, se añade estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina, que queda ligada a cualquier híbrido biotinilado que se haya formado con anterioridad. La incubación con una solución de sustrato que contiene un cromógeno produce un

precipitado de color púrpura/marrón. La reacción se interrumpe mediante una fase de lavado, tras la que se registra el patrón de reactividad de las sondas⁵⁶.

3.6 Métodos de Conservación de ADN de VPH

3.6.1 Fase Líquida

En la actualidad, la detección del VPH se realiza en muestras cervicales recogidas en medio líquido por un médico especialista, que a menudo es poco práctico o no está disponible en las zonas remotas y en los países en vías de desarrollo.

Las muestras de las células cervicales exfoliadas se recogen en tampón fosfato salino (PBS), que es barato pero requiere refrigeración constante, o en diversos medios líquidos, tales como STM o PreservCyt, Easy Fix, que preservan el DNA del VPH a temperatura ambiente, pero son caros. Además muchos de estos productos como el, PreservCyt y Easy Fix son inflamables por lo que dificultan su importación a países en vías en desarrollo.

3.6.2 Métodos Alternativos

3.6.2.1 Láminas de Citología

Para la detección del VPH existen varios métodos en la fase seca, es decir muestras desecadas. Por ejemplo: muestras de láminas de citología cérvico-uterinas son una fuente importante para el estudio de VPH en pacientes con cáncer. Con todo esto, los datos son controversiales al respecto unos afirman que hay mayor riesgo de contaminación y alteraciones que pueden afectar el ADN (Por ejemplo, el ADN en láminas de citología puede ser afectado por el uso de colorantes, resinas, etanol, entre otros, que son reconocidos como contaminantes que inhiben la amplificación mediada por la PCR)^{42,43}, siendo contraproducente para los resultados de los estudios, sin embargo reportes de Seperhr N.et al 2010 han obtenido buenos resultados³.

3.6.2.2 Tarjetas FTA Whatman

Las tarjetas FTA (consisten en papel Whatman impregnados con químicos patentadas que lisan las membranas celulares y desnaturaliza proteínas. De esta forma los ácidos nucleicos son atrapados, físicamente siendo inmovilizados y estabilizados. Una vez inmóvil, el ácidos nucleicos queda protegido de nucleasas, oxidación, daño bacteriano y hongos pudiendo ser almacenados a temperatura ambiente por años), este es un medio corrientemente utilizado para transportar y archivar todos los ácidos nucleicos a la temperatura del ambiente ^{44,47}.

Otra alternativa Según Feng Qinghua et al 2010 se puede obtener DNA a partir de muestras secas tomadas en torundas almacenados a temperatura ambiente, aunque con un aumento en el número de muestras insuficientes y con sensibilidad marginalmente menor para la detección de VPH⁴⁶.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material Biológico

- Cepillados Cervicales

4.2 Material de laboratorio

- Tarjetas FTA, Laminas de vidrio (porta objeto)
- Micro punch, Bisturí
- Tips estériles con filtro
- Sobres estériles

4.3 Equipos

- Termociclador (Bio-Rad)
- Baño en seco (Fisher Scientific)
- Vortex (Fisher Scientific)
- Trans iluminador de Luz ultravioleta
- Equipo de Electroforesis (Enduro GEL XL).
- Fridge a -20°C
- Micro centrífuga
- Pipetas (P10, P200, P1000)
- Incubadora (56°C)

4.4 Reactivos

- Agua destilada estéril
- Agarosa
- TAE 50 X; TAE 1 X (ver en anexo 3)
- Bromuro de Etidio
- Tampón PK-1 (ver en anexo 2)
- β - globina (ver anexo 7)
- PGMY 09/11 (ver anexo 8)

4.5 METODOLOGÍA

4.5.1 Lugar y Duración de Estudio

El presente estudio se realizó en el laboratorio de VPH – VIH de la Facultad de Medicina de la Universidad Mayor de San Simón de Cochabamba. Este estudio tuvo una duración de 5 meses (septiembre 2012 - Enero 2013), con el muestreo y procedimiento de muestras.

4.5.2 Población de Estudio

Se colectaron muestras de células endocervicales o exocervicales de mujeres entre 18 y 65 años que acudieron a la consulta externa ginecológica del Hospital Materno Infantil Germán Urquidi, Hospital de referencia de tercer nivel de Cochabamba. La toma de muestras fue realizada por el doctor Jaime Barriga (Ginecólogo del Hospital).

4.5.3 Criterios de inclusión

- Mujeres a partir de los 18 a 65 años.
- Contar con un estudio citológico siguiendo el sistema de clasificación Bethesda (ver anexo 10) y/o histopatológico.
- Todas las pacientes que aceptaron participar en el estudio firmaron un consentimiento informado ver (anexo 1), aprobado por el Comité de ética de la Facultad de Medicina de la UMSS.

4.5.4 Criterios de Exclusion

- Mujeres histerectomizada
- Aplicación de tratamiento farmacológico vía vaginal reciente
- Embarazo actual
- Mujeres menstruando.

4.5.5 Recolección de muestras

Antes de la toma de muestra cada paciente tuvo su examen ginecológico y su revisión colposcopia realizado por el especialista.

Para la toma de muestra de células cervicales, se utilizó un cepillo colector (Rovers Cervex-Brush) que colecta células exocervicales y/o endocervicales, estas fueron extendidas ya sea en una lámina limpia (porta objetos), o en las tarjetas FTA Whatman para luego ser depositadas en un frasco estéril que contenía 10 ml del buffer Easy Fix.

4.5.5.1 Frotis en Láminas

Inmediatamente extendidas las células sobre las láminas de vidrio, estas fueron fijadas rápidamente con un fijador/espray (Aqua Net) a una distancia de aproximadamente 15 centímetros del portaobjetos para evitar la dispersión del material recogido, luego se dejaron secar durante 5 min (figura 6). Cada lámina fue guardada en un sobre estéril correctamente identificado a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

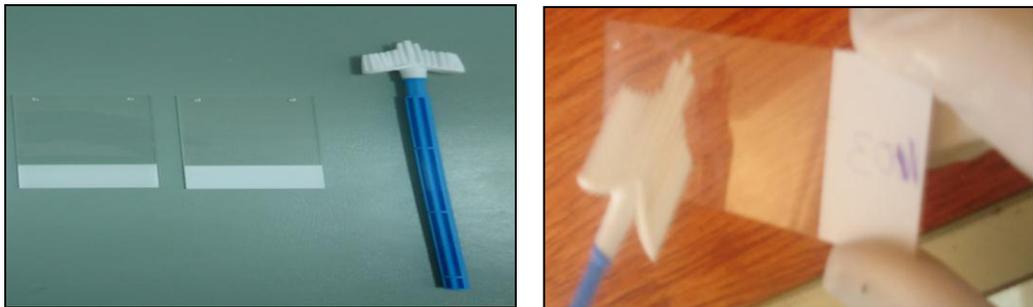


Figura 6: Extendido de células cervicales en láminas de porta objeto.

4.5.5.2 Tarjetas de FTA (Whatman)

Las tarjetas FTA están diseñadas con cuatro círculos, sin embargo las muestras fueron extendidas con cuidado sobre las tarjetas FTA en solo 2 círculos por paciente (cortadas previamente en forma vertical), como se puede observar en la (figura 7), luego estas fueron secadas a temperatura ambiente durante 15 min. Cada tarjeta

fue guardada en su respectivo sobre estéril, previamente etiquetado a temperatura ambiente hasta su procesamiento.



Figura 7: Extension de células cervicales en las tarjetas FTA

4.5.5.3 Buffer Easy Fix

La solución de Easy Fix fue utilizada como un control patrón (Gold Standard), este buffer de recolección y conservación de células cervicales es utilizado de manera rutinaria en el laboratorio HIV-VPH de la Facultad de Medicina UMSS. Los cepillos colectores que fueron utilizados para la toma de muestra en frotis en láminas o tarjetas FTA, fueron depositados en 10 ml de buffer Easy Fix como se observa en la (figura 8). Los 10 ml de Easy Fix se agitaron en vortex 1 minuto con el fin de desprender las células del cepillo., esta suspensión celular fue transvasada a un tubo Falcón de 15 ml y centrifugada a 3000 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se re suspendió en 2 ml de Easy Fix, la cual fue almacenada a 4°C hasta su procesamiento de extracción de ADN (Esta suspensión puede ser conservada por mucho tiempo sin alterar el ADN que pudiera estar presente).

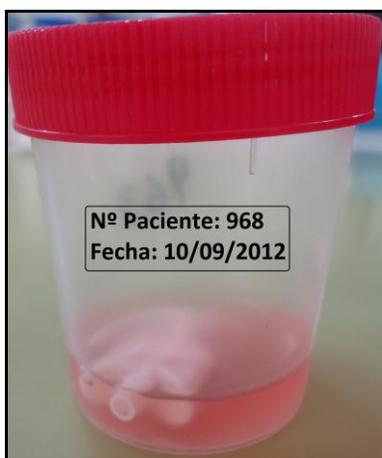


Figura 8: Muestra recolectada y conservada en el Buffer de Easy Fix

4.6 Extracción de ADN

Las extracciones del ADN se realizaron entre los 15 y 30 días después de la toma de muestra. Una vez extraído el material genético inmediatamente se realizó la PCR para amplificar el gen de la β -globina y PGMY 09/11 con sus respectivos cebadores.

4.6.1 Extracción a partir frotis en láminas

Primero, las láminas se remojaron por unos 5 segundos con el tampón PK (anexo 3), segundo, con la ayuda de un bisturí se raspo cuidadosamente el material que contenía la lámina. La suspensión obtenida fue recolectada en tubos Eppendorf de 1,5 ml y llevada a incubación a 56 °C toda la noche. Luego de esta incubación, los tubos fueron sometidos a 98°C por 10 min en un termo bloque para inactivar la proteinasa K, después de una centrifugación por 10 min a 14 000 rpm se recuperó el sobrenadante con el ADN y se conservó a -20 °C hasta la realización de la PCR.

4.6.2 Extracción a partir de tarjetas FTA Whatman

Para el proceso de extracción a partir de las tarjetas FTA, se recortaron círculos de 3 milímetros de diámetro con una perforadora (figura 9). Estos círculos fueron depositados en tubos eppendorf estériles de 1.5 ml a los que se les agregó 500 ul de agua destilada estéril. Después de haber mezclado en vortex por 5 segundos, se extrajo el circulo transfiriéndolo a un tubo eppendorf de 0,2 ml estéril, se añadió 30 ul

de agua estéril, seguidamente se colocó en el termo bloque calentador por 30 minutos a 98°C y finalmente descartando el círculo, se conservó esta solución que contiene el ADN a - 20 °C.



Figura 9: Preparación de los 3 mm de \varnothing de las tarjetas FTA.

4.6.3 Extracción a partir de EASY FIX

Para las muestras obtenidas en Easy Fix se utilizó el método de congelación descongelación (protocolo laboratorio VPH Veronique Fontaine) con el siguiente procedimiento: primero, para la extracción se tomó 500 μ l de la muestra y se colocó a un tubo de eppendorf de 1.5 ml, se centrifugo a 3000 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet celular re suspendiéndolo en 1 ml de PBS, se volvió a centrifugar por 10 min a 3000 rpm para finalmente eliminar el sobrenadante dejando únicamente el pellet, el cual se re suspendió con 200 μ l de tampón (10mM Tris pH 7.5), se alicuotó en dos tubos eppendorf de 0.5 ml y se llevó a congelación a -70°C por mínimamente 2 horas, luego se llevó a denaturación sometiéndolo un choque térmico de 95°C durante 15 min en el termociclador, inmediatamente después se centrifugo, se recuperó el sobrenadante y se conservó a - 20 °C hasta la realización de la PCR.

4.7 Evaluación de la calidad del proceso de extracción de ADN humano

La evaluación de la calidad del proceso de extracción de ADN se realizó mediante la amplificación del gen de la β -globina⁴. Como un control interno de la calidad del ADN y ausencia de inhibidores de la PCR, con los que se obtiene un producto de 268 pb⁵⁴.

Para verificar la calidad del ADN extraído, se amplificó un segmento de 268 pb del gen constitutivo de la β -globina humana como se puede observar (anexo 7).

Las concentraciones de los diferentes componentes utilizados para la β -globina se puede observar en la (tabla 3).

Tabla 3: Preparación de la solución Mix β -globina protocolo laboratorio VPH Veronique Fontaine.

Componentes	Concentracion final	Vol = 50 μ l
H ₂ O		19,75
MgCl ₂	3,5 mM	7
Fuffer	1 x	10
d NTPS (10mM de mix)	0,2 mM	1
Primer GH 20 (10 mM)	0,2 μ M	1
Primer GH 40 (10 mM)	0,2 μ M	1
Got taq (5 U/ μ l)	1,25 U	0,25

El programa de amplificación se muestra en la (tabla 4) siguiendo el protocolo del laboratorio de VPH

Tabla 4: Programa de amplificación para el gen de β - globina utilizando el termociclador Bio Rad

Cycle 1 (1 x)	Step 1	95° C	15 min
Cycle 2 (35 x)	Step 1	95° C	30 sec
	Step 2	55° C	30 sec
	Step 3	72° C	1 min
Cycle 3 (1 x)	Step 1	72° C	10 min
Cycle 4 (1x)	Step 1	4° C	∞

4.8 Evaluación de la capacidad de conservación del ADN viral

Las muestras que resultaron positivas para la amplificación del gen constitutivo de β -globina humana, fueron sometidas a detección de ADN de la región L1 del genoma viral, rastreando su presencia. Para la PCR se utilizaron los primers PGMY 09/11 como se puede observar en (anexo 8) de detección genérica viral. La amplificación con PGMY 09/11 se realizó en un volumen final de 25 μ L con las siguientes concentraciones (tabla 5).

Tabla 5: Los cuidados de esta solución Mix puede ser preparado por adelantado libre de ADN, puede ser alicuotó y conservado a -20°C hasta su utilización.

Productos	Concentracion final	Volumenes
H ₂ O		19,75
MgCl ₂ (50 mM)	4	8
Buffer (10x) sin MgCl ₂	1 x	10
d NTPS (1.25 mM)	0,2 mM (de mix)	1
Primers PGMY100 mM	0,2 μ M	1
Taq	1,25 U	0,25
Volumen Total		50

Las condiciones de termociclador Bio Rad se muestra en la (tabla 6).

Tabla 6: Programa del termociclador para la amplificación de la PGMY 09/11.

Programas de PCR optimalices pour l'appareil Cycler Biorad				
PGMY	Enzyme iTaq BioRad	Programme appareil	PGMY itaq 2006	MgCl ₂ 4mM
Cycle 1 (1 x)	Step 1	95 °C	3 min	
Cycle 2 (40 x)	Step 1	95 °C	30 sec	
	Ramp to 94° C 2,2°C/Sec		30 sec	
	Step 2	55 °C	1 min	
	Ramp to 55° C 2,7°C/Sec			
	Step 3	72 °C		
	Ramp to 72° C 2,2°C/Sec			

4.9 Análisis electroforético del ADN en geles de agarosa

Los resultados de ambas amplificaciones fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, buffer TAE 1X corridas a 100 voltios durante 30 min. Se utilizó como agente intercalante el bromuro de etidio a una concentración de 1 ug/ ml y visualizados en el trans iluminador para determinar la presencia o ausencia del ADN humano y viral.

4.10 Análisis de datos

La comparación de los tres métodos se realizó mediante el Test de Kappa. Este test evalúa la concordancia entre dos o más variables de tipo categórico, es decir el grado de acuerdo entre variables. Se utilizó como criterio para el rechazo de la hipótesis nula un valor de $P < 0,05$ (ver anexo 9). Este análisis se realizó en el programa (SPS 200X). Para la comparación de proporciones entre los tres métodos se utilizó el test de Fisher.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se obtuvieron y analizaron muestras de un total de 84 mujeres en aparente buen estado general de salud, las cuales referían al menos una pareja sexual, y contaban con un diagnóstico citológico y/o anatómico-patológico.

El rango de edad de la población en estudio fue de 18 a 65 años, distribuidas de la siguiente manera: 15,5 % comprendidas entre 18-25 años de edad; el 32,1 % 26 a 33 años; 21,4 % entre 34- 41 años; 14,3 % de 42 - 49 años; 13,1 % estaban entre 50 a 57 años; y con una minoría de 3,6 % entre los 58 - 65 años (Figura 10).

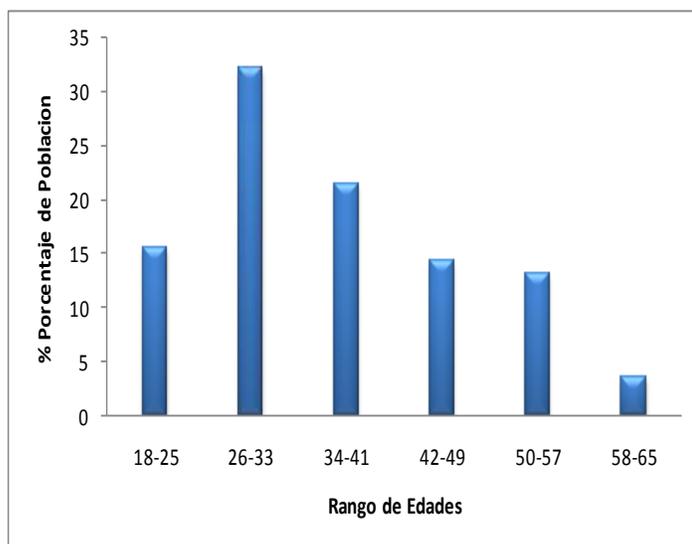


Figura 10: Distribución de la población muestreada según rangos de edad

Como se observa en la figura 10 más del 50% de nuestra población se encuentra entre 18 y 49 años y presenta una amplia dispersión en cuanto a su diagnóstico citológico.

El resultado del diagnóstico de Papanicolaou de estas 84 mujeres se muestra en la Figura 11. Como se puede observar, aproximadamente el 61,9 % (n = 52) tienen una citología normal y/o inflamatoria es decir no tienen lesiones intra-epiteliales o malignidad, 19,5% (n=16) presentan lesiones de bajo grado LIE-B y 15 de las

pacientes tienen lesiones intra-epiteliales escamosas de alto grado (LIE-A) y una sola paciente reporta carcinoma.

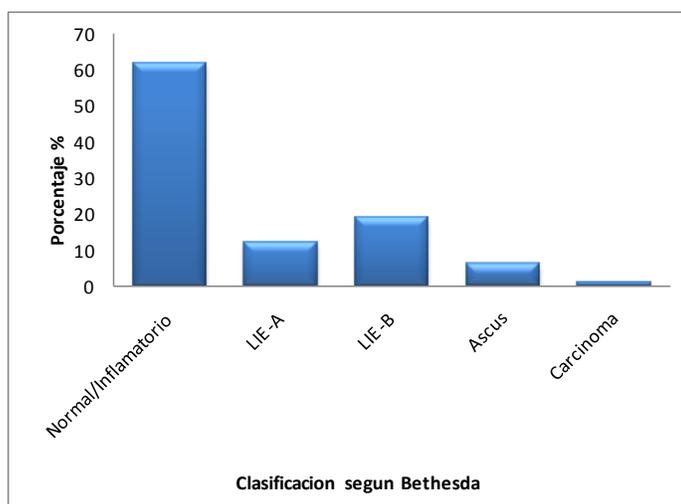


Figura 11: Porcentaje de diagnóstico citológico según la población

5.1 Puesta a punto de las técnicas de recuperación de ADN celular y Viral a partir de Tarjetas de FTA Whatman y Frotis en Láminas.

En base a las recomendaciones del productor (GE Healthcare Life Sciences) FTA™ Elute Cards y siguiendo las sugerencias del Dr. Sergio Crovella Department of Genetics, Federal University of Pernambuco (Conversación personal y comunicación vía Email) hemos adaptado el método de recuperación de ADN para las muestras extendidas en las tarjetas FTA. Para la recuperación de ADN a partir de frotis en láminas hemos seguido el protocolo de laboratorio de VPH, el cual ha sido recomendado por Veronique Fontaine del laboratorio de Microbiología de La Universidad Libre de Bruselas. Por lo tanto en este estudio, hemos puesto a punto dos métodos sencillos de obtención de ADN a partir de células cervicales, cuyos procedimientos técnicos han sido descritos detalladamente en materiales y métodos.

El proceso de recuperación de ADN a partir de Tarjetas FTA Whatman consiste en 2 pasos; el primero, es un lavado sencillo del papel filtro (que contiene la muestra disecada) con agua destilada estéril, en este paso se eliminan las impurezas (la mayor parte de la basuras (restos celulares). El segundo paso consiste en la

extracción por elusión con agua destilada del ADN mismo y la inactivación de enzimas (nucleasas presentes normalmente en las células) a 95°C. Este proceso dura menos de una hora y no requiere reactivos caros y equipos de conservación. La matriz de FTA que hemos utilizado, esta químicamente tratada con reactivos patentados que lisan las células, desnaturalizan proteínas y protegen los ácidos nucleicos de nucleasas (liberados por las células)⁵¹.

El proceso de recuperación de ADN a partir de frotis en láminas adecuado en este trabajo consiste en tres etapas; la primera es la recuperación de la muestra extendida en la lámina mediante el remojo (embebido) por unos segundos con tampón PK (tampón en base a proteinasa K), TRIS y dos detergentes (NP40 y Tween 20). La proteinasa K es una endopeptidasa que ayuda digerir las proteínas, lisa las células y remueve contaminaciones. Luego, la suspensión de células recuperada en el tampón PK, es sometida 56°C toda la noche, se sabe que la acción de la PK se incrementa a esta temperatura. Por último esta suspensión se somete a 98°C, con el objetivo de inactivar todas las enzimas.

La toma y el transporte de muestras cervicales con ambos métodos es sencillo, ambos son realizados a temperatura ambiente y requieren poco espacio de almacenamiento. En cuanto al tiempo de procedimiento para la extracción del ADN, desde el inicio hasta la obtención del material genético es de aproximadamente 24 horas a partir del frotis en láminas, mientras a partir de las tarjetas FTA es de menos de una hora.

En cuanto a los costos de ambos métodos, las tarjetas FTA Whatman tienen un costo más elevado (aproximadamente 2.5 \$us por paciente) aunque solo se utiliza agua destilada como reactivo de recuperación, mientras que el costo del frotis en láminas, incluyendo los reactivos de elución es de aproximadamente 0.5 \$us, un costo mucho menor.

5.2 Evaluación de la calidad del proceso de extracción del ADN humano, a partir de muestras conservadas en tarjetas FTA Whatman y frotis en lámina en comparación con Easy Fix mediante la amplificación del gen de la β -globina.

Para la evaluación de los dos métodos propuestos, hemos dividido a nuestra población de estudio en 2 grupos; un grupo de 40 pacientes a las cuales se les realizó un cepillado cervical para extenderlo en las tarjetas FTA Whatman y para colocarlo en la solución de Easy Fix como control. A otro grupo de 65 mujeres se les tomó las muestras de cepillado cervical para extenderlas en lámina por un lado y por otro lado para colocarlas en la solución de Easy Fix para su comparación, 21 de estas pacientes también fueron muestreadas para las tarjetas FTA.

El gen de la β -globina es utilizado corrientemente como control interno de la prueba de detección y amplificación de ADN celular, con esta prueba se evalúa la calidad de la muestra. La mayoría del material genético extraído a partir de las tarjetas FTA y Frotis en láminas permitió la amplificación de un fragmento 268 pb correspondiente al gen de β -globina, una corrida electroforética tipo se muestra en la (Figura 12).

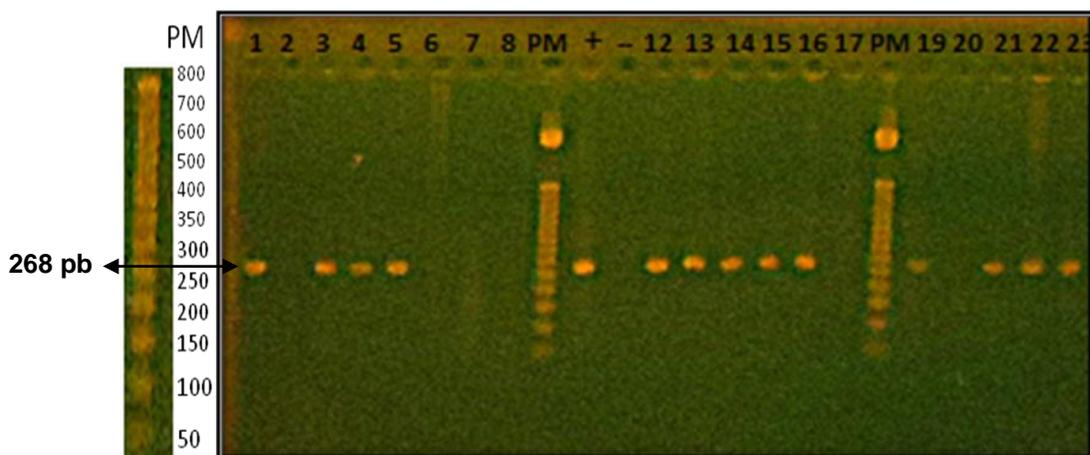


Figura 12: Amplificación del gen de la B-globina revelado con bromuro de etidio después de una electroforesis en el gel de agarosa al 2%. Los carriles 1, 3-5, 12-16 y 20 al 21 con bandas con fuerte intensidad, muestran una alta concentración de DNA. El carril 18 con una banda de menor intensidad se consideró con una suficiente concentración de DNA. En los carriles 2, 6-8, 17 y 19 en los cuales no se observa ninguna banda se considera como ausencia de amplificación.

De las 40 muestras que hemos analizado para comparar FTA vs Easy Fix (Figura 13), se pudo amplificar el gen de la β -globina en 39 (98 %) de las muestras provenientes del eluido del papel FTA, en cambio solo 35 (87.5%) de las muestras provenientes de Easy fix dieron positivo para β -globina, esta diferencia de proporciones no es significativa según la prueba exacta de Fisher, ($p = 0,2$).

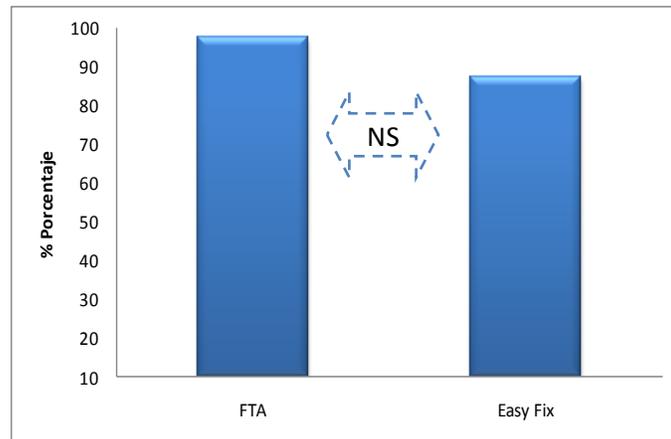


Figura 13: Comparacion de los porcentajes de muestras, β -Globina positivas obtenidos a partir de tarjetas FTA vs Easy Fix.

En el caso de la comparación laminas vs Easy fix mostrado en la Figura 14, del total de 65 muestras analizadas por ambos métodos, 60 (92,3%) muestras provenientes de lavado de frotis en láminas dieron positivo para β -globina, y 62 (95,4%) dieron positivas a partir de Easy fix y el resto de las muestras fueron negativas. Ambos métodos muestran similar capacidad de conservación y recuperación del material genético proveniente de células cervicales ($p = 0.72$, test de Fisher).

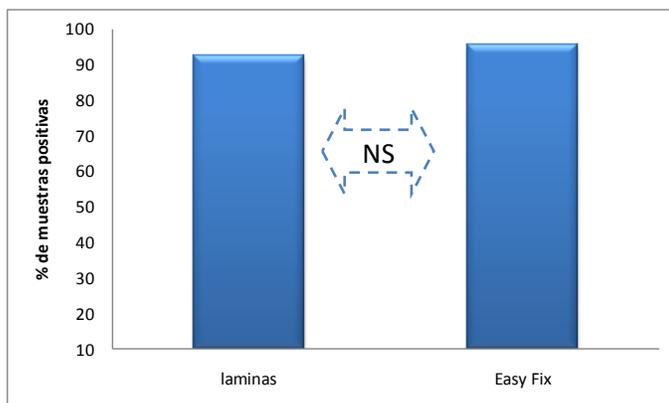


Figura 14: Comparacion de los porcentajes de muestras β -Globina, positivas obtenidos a partir de Laminas vs Easy Fix.

De las 21 muestras que hemos utilizado para comparar tarjetas FTA vs frotis en láminas Figura 15, se pudo amplificar el gen de la β -globina en las 21 muestras (100 %) provenientes a partir del eluido del papel FTA, y en 20 muestras (95.2%) provenientes a partir de frotis en láminas ($p = 1$ test de Fisher).

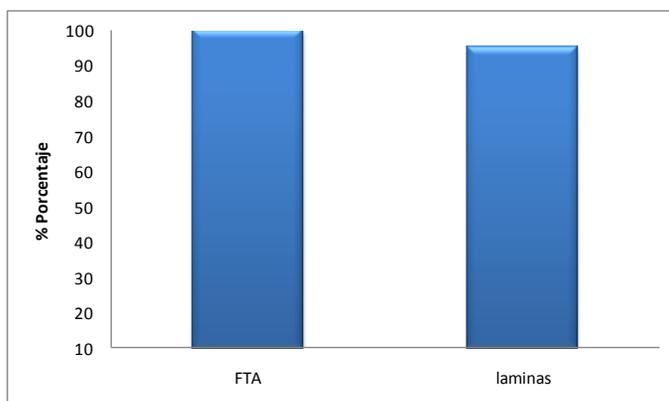


Figura 15. Comparacion de los porcentajes de muestras, β -Globina positivas obtenidos a partir Frotis en Laminas vs Tarjetas FTA.

Tomando en cuenta estos resultados podemos decir que la capacidad de recuperación de material genético de células cervicales a partir de frotis en Lámina, tarjetas FTA y Easy fix son similares Tabla 7.

Tabla 7. Resumen de la comparación de los resultados de β - globina obtenidos por los tres métodos de preservación de DNA expresados en porcentaje.

	Tarjetas FTA	Easy	Frotis en Láminas	Easy Fix	Tarjetas FTA	Frotis en Láminas
n*	40		65		21	
%**	97,5	87,5	92,3	95,4	100	95,23
* número de pacientes por grupo			** porcentaje de pacientes positivas de β -globina			

Aunque los porcentajes de recuperación a partir de las tarjetas FTA son mayores, esta diferencia no es significativa, por ende la capacidad de conservar y recuperar DNA celular es la misma para los tres métodos de conservación.

A pesar de la facilidad de transporte de estos tres métodos, el frotis en lámina y las tarjetas FTA son más fáciles de manipular ya que requieren menor cuidado para su almacenamiento y conservación (conservación a temperatura ambiente), mientras que el método del buffer Easy Fix es un medio líquido, que requiere mayor espacio y cuidado (para evitar derramamientos).

En cuanto a costos, las tarjetas FTA tienen un elevado costo, como también el buffer de Easy Fix, mientras que el frotis en láminas es mucho más barato.

5.3 Evaluación de la capacidad de conservación del ADN viral mediante la amplificación del segmento L1 del genoma de VPH

Para esta PCR se utilizaron los primers PGMY 09/11, que son un conjunto de cebadores que amplifican la fracción L1 del ADN viral según las concentraciones y condiciones que se menciona en metodología y siguiendo el mismo esquema de comparación entre los materiales genéticos extraídos del papel FTA, frotis o Easy Fix.

Una vez llevado a cabo la PCR, el producto amplificado fue sometido a una electroforesis en gel de agarosa al 2 % y revelado con bromuro de etidio. El producto de la amplificación correspondiente a la región L1 de VPH con primers PGMY puede ser observado en la figura 2, esta banda corresponde a un amplificado de una fracción de 450 pb, como se muestra en la (Figura 16). Cabe recalcar que toda muestra negativa para la amplificación de PGMY en ausencia de la amplificación del gen del la β -globina no fue considerada.

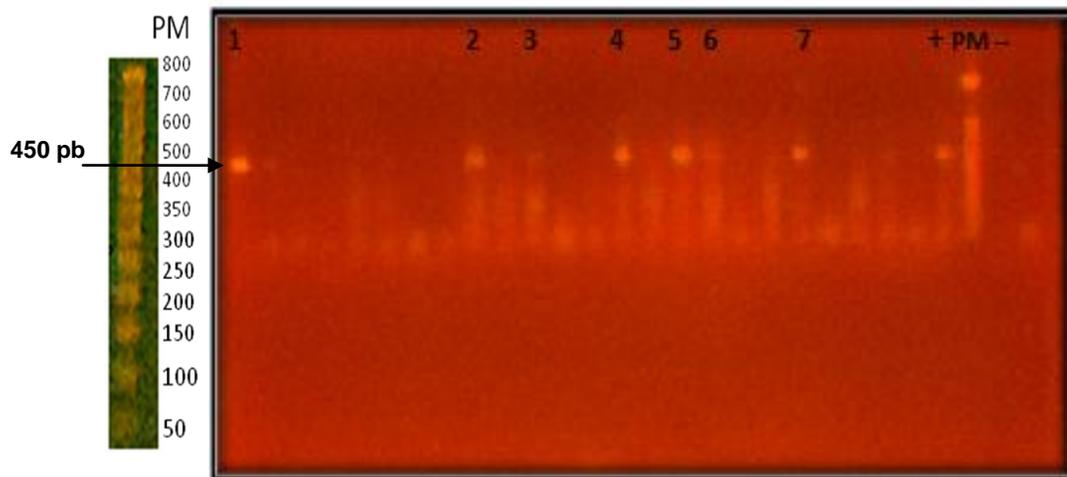


Figura 16: Detección viral mediante PCR con iniciadores PGMY 9/11. 10) Control negativo H₂O, 8)Control Positivo Interno (Siha) 9)Marcador de Peso Molecular 450 pb (1 ng). En el carril 1 - 7 se observa la banda de 450 pb, que indica la presencia en la muestra del virus del VPH.

5.3.1 FTA vs Easy fix

Se muestra los resultados comparativos de la amplificación del ADN de VPH obtenidos a partir de las tarjetas FTA y Easy fix. El ADN viral fue detectado en 15 (37.5 %) de las 40 muestras tomadas en FTA, en cambio el ADN de VPH fue detectado únicamente en 13 (32.5 %) a partir de Easy fix. Con ambos métodos podemos detectar la presencia de VPH, sin embargo dos muestras eluidas a partir de FTA que eran positivas para VPH, dieron resultado negativo cuando se analizó el extraído a partir de Easy fix. En ambas muestras se pudo amplificar la β -globina, aunque la banda amplificada a partir de la muestra conservada en Easy Fix era de menos intensidad, esto nos hace suponer que existe una cantidad razonable de ADN celular, aunque en menor concentración, lo que podría explicar esta diferencia. Sin embargo pese a estas diferencias, se puede observar que existe una coincidencia del 95% en los resultados (en 38 de 40 muestras se obtienen los mismos resultados), con un índice de Kappa de 0.88 a favor de FTA, y de acuerdo a la valoración del índice de Kappa esta concordancia es **Muy buena** (tabla 8).

Tabla 8: Tabla de Contingencia 2x2 de los resultados de detección del VPH mediante la amplificación con primers PGMY 09/11 en material genético extraído a partir de tarjetas FTA vs Easy Fix.

Tarjetas FTA	Buffer Easy fix		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	13	2	15
Negativo	0	25	25
Total	13	27	40

5.3.2 Frotis en Láminas vs Easy Fix

En la tabla 9 se muestra los resultados de la comparación de la amplificación del ADN viral a partir de material genético obtenido en frotis en láminas y Easy fix. El ADN viral fue detectado en 11 (16.9 %) de las 65 muestras provenientes del frotis en láminas, en cambio, 14 de las 65 muestras (21.5 %) fueron positivas a partir de las muestras extraídas de Easy fix. Dos muestras provenientes del material extraído de

Easy fix en las que se pudo amplificar ADN viral no pudo ser amplificado a partir del material obtenido de láminas. La coincidencia de resultados tanto positivos y negativos entre ambas técnicas es 89 % (58 de 65 muestras) con un índice de Kappa de 0.65 a favor de Easy fix, calificada como **buena** concordancia.

Tabla 9. Tabla de Contingencia 2x2 de los resultados de detección del VPH a partir de Frotis en Láminas vs Easy Fix

Laminas	Buffer Easy fix		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	9	2	11
Negativo	5	49	54
Total	14	51	65

5.3.3 FTA vs Frotis en Láminas

La comparación de la extracción de DNA a partir de muestras obtenidas en frotis en lámina con el papel FTA muestra que el DNA viral fue detectado en 9 (42.85 %) de las 21 muestras tomadas en FTA, mientras que en los extraídos a partir del frotis en láminas solamente se detectó DNA de VPH en 6 muestras (28.5 %). Con la técnica de las tarjetas FTA se pudieron detectar 3 muestras positivas más que con el método de frotis en láminas. La tabla de contingencia (tabla 10) muestra que 85% (18 de 21) de las muestras obtenidas con ambos métodos coinciden en detectar positivos y negativos, esta concordancia es **buena** (Kappa de 0,69 y su P= 0,015) y es inferior en comparación a los otros métodos.

Tabla 10. Tabla de Contingencia 2x2 de los resultados de detección del VPH a partir de frotis en láminas vs tarjetas FTA.

Laminas	Tarjetas en FTA		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	6	0	6
Negativo	3	12	15
Total	9	12	21

Las diferencias entre los distintos ensayos para identificar VPH, muestran el grado de concordancia aplicando el test índice de kappa para la comparación entre tarjetas FTA vs Easy fix el valor de 0,88 **fue de muy buena**, mientras que el frotis en Laminas de citología cervical vs Easy Fix el valor de 0.65 fue **buena** y FTA vs Laminas fue de 0,69 **fue buena**. En ambas comparaciones el valor del índice kappa se interpreta como la concordancia entre ensayos para reconocer muestras positivas o negativas.

Los resultados que hemos obtenido muestran que la preservación y extracción de ADN del VPH a partir de papel FTA es muy buena, dado que hay una mayor proporción de muestras con resultados positivos para VPH en comparación con el frotis en lamina e inclusive con el Easy Fix. Esto nos indica que con este método se ha preservado/extraído mejor el ADN viral a pesar de que para la extracción de la misma solo se utilizó un disco de aproximadamente de 3 mm de diámetro. El orden de muestreo no parece afectar estos resultados ya que siempre la muestra tomada fue primero depositada en la lámina o tarjetas FTA y luego en buffer Easy Fix. Nuestros resultados coinciden, con otros reportes sobre estudios de comparación y transporte de células cervicales los cuales muestran resultados óptimos de recuperación Inger Gustavsson et. al. 2011; Roosmarie P. de Bie et. al. 2011 similar a los resultados que nosotros hemos obtenido^{5,6}.

Según William Burgos et.al. 2007 el diámetro de los discos es un factor determinante para el éxito de extracción¹⁴, Inger Gustavsson et. al. 2011 aconseja la utilización de más de 1 disco de 3 mm para obtener un buen rendimiento, nosotros con un disco de 3 mm de diámetro hemos obtenido muy buenos resultados⁵.

Philip E. Castle et. al 2007 los cuales evidenciaron que el método de las tarjetas FTA es muy útil como un medio de transporte y preservación de ADN viral (VPH) en muestras de enjuague bucal⁹. Además que puede ser utilizado para la toma de muestras de diferentes fluidos, como: sangre, saliva, células epiteliales (Prieto et.al. 2006)¹⁶ con un alto grado de bioseguridad. (Francisco Perozo et.al. 2006)¹⁵.

En cuanto al uso de frotis en lámina, nuestros resultados muestran, para la amplificación del gen de la β -globina es comparable al Easy Fix, mientras que para la amplificación del gen L1 del VPH es menos eficiente que el Easy Fix y FTA. Shibata et.al. 1988 25 y Greer CE et.al 1991²⁶, indican que la eficiencia de recuperación de ADN depende del método de extracción, y también del tamaño de fracción amplificada.

Varios estudios Jackson DP. et.al. 1989¹⁷, Poljak M et.al. 1996¹⁸, muestran que la calidad de ADN obtenido a partir de muestras cervicales en láminas es buena inclusive después de los 10 años de conservación: de Roda et.al.1995¹⁹ obtuvieron 98% de recuperación, de ADN celular en muestras que fueron conservadas 9 años en las cuales pudieron detectar ADN de VPH. El mismo autor junto a Seperhr N.et.al 2010³ indican que el rendimiento y el tamaño de los fragmentos de ADN decrecen con el tiempo, por lo tanto la amplificación del ADN de una fracción no superior a 200 pb es aconsejable en muestras con mucho tiempo de conservación, o muestras que sufren otros procesos durante su preparación. En nuestro caso el porcentaje de recuperación de ADN celular fue similar a los resultados obtenidos a partir de FTA o Easy Fix, pero los resultados de la amplificación del ADN de VPH fueron inferiores cuando se compara a los dos otros métodos analizados. El orden de muestreo no parece ser la causa de estos resultados ya que la extensión de la muestra fue primero en las láminas de vidrio (frotis en láminas) y luego fue depositada en el Easy Fix o FTA., Dr.Coralía et.al. 2010²⁴

VI. CONCLUSIONES

- En este estudio hemos puesto a punto dos métodos: la obtención de ADN viral a partir de muestras cervicales conservadas y transportadas en tarjetas FTA y Frotis en Láminas. Ambos métodos son sencillos y de fácil aplicación para la obtención del ADN tanto celular como viral.
- Mediante la amplificación del gen de la β -Globina se pudo probar que la conservación del ADN celular humano a partir de muestras cervicales por los dos métodos de transporte (Tarjetas FTA, Frotis en Láminas) son similares, ya que en la comparación realizada con muestras conservadas en Easy Fix no se obtuvo diferencias significativas, por lo tanto ambos métodos tienen similar capacidad de preservar el ADN celular.
- La capacidad de conservación del ADN viral mediante la amplificación de la región L1 con primers de PGMY 09/11, medida por el test de concordancia de índice Kappa muestran que las tarjetas FTA es el mejor método para preservar el ADN viral dada la mayor proporción de muestras con resultados positivos inclusive que el Easy Fix. El método de Frotis en Lámina resulto ser menos eficiente que el Easy Fix en nuestro estudio.
- De los dos métodos propuestos (Tarjetas FTA y Frotis en Láminas) el método más aconsejable para el transporte y conservación resulta ser el de papel filtro FTA.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda: Realizar futuras investigaciones aumentando el número de muestras y comparar la recuperación de ADN de VPH a diferentes intervalos de tiempo ej. Después de 1, 2, 3 meses, inclusive por tiempos prolongados como 1 año o más, también se podría incrementar en la población de estudio casos con diagnósticos presuntivos como LIE-A, con el fin de obtener más casos VPH positivos
- Comparar el método de papel filtro FTA Whatman con el papel filtro común Whatman, y así establecer si este último es conveniente para fines de recolección de muestras cuál, esto dado los precios del papel FTA.
- En caso del método de conservación de muestras en frotis en lámina, valdría la pena probar la detección del ADN de VPH con otros cebadores, que amplifiquen fracciones más pequeñas del genoma de VPH por ej: la amplificación con cebadores GP5+/GP6+ o SPF10, ambos cebadores amplifican una fracción de DNA cuya longitud es de 150⁴⁸ pb o 65⁴⁹ pb respectivamente de la región L1 del genoma de VPH.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Muñoz, N., Castellsagué X, AB de González, y L. Gissmann. De 2006. Capítulo 1.: El VPH en la etiología del cáncer humano Vacuna 24 (S3): S1-S10 [PubMed]
2. Burd EM. "Human Papillomavirus and Cervical Cancer", en *Clinical Microbiology Reviews*, 2003, 16 (1): 1-17.
3. Sepehr N. Tabrizi, PhD Nicole Taylor, BS Michael J. McCullough, PhD Gillian Phillips, BS John Wark, MD, PhD Dorota Gertig, MD Rodney W. Petersen, MD Marion Saville, MD and Suzanne M. Garland, MD on behalf of the CeCaGe En Study Group Human Papillomavirus Genotype Detection From Archival Papanicolaou – Stained Cervical Tests December 25,2010
4. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-4.
5. Inger Gustavsson a, Karin Sanner, Monica Lindell, Anders Strand Matts Olovsson, Ingrid Wikström, Erik Wilander, d, Ulf Gyllensten, Type-specific detection of high-risk human papillomavirus (HPV) in self-sampled cervicovaginal cells applied to FTA elute cartridge, *Journal of Clinical Virology* 51 (2011) 251-254.
6. Roosmarie P. de Bie,* Channa E. Schmeink, Judith M.J.E. Bakkers, †Peter J.F. Snijders, ‡Wim G.V. Quint, § Leon F.A.G. Massuger, Ruud L.M. Bekkers,* and Willem J.G. Melchers, A Solid Sample Carrier to Detect High-Risk HPV and High-Grade Cervical Lesions, *JMD* July 2011, Vol. 13, No. 4
7. Documentos de Consenso S.E.G.O 2002 Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia
8. Plan Nacional de Prevención Control y Seguimiento de Cáncer de Cuello Uterino 2009-2015.
9. Philip E. Castle, Mark Sadorra, Francisco A.R. Garcia, Allison P. Cullen, Attila T. Lorincz, Amy L. Mitchell, Denise Whitby, Ronald Chuke, and Janet R. Kornegay, Mouthwash as a Low-Cost and Safe Specimen Transport Medium for Human Papillomavirus DNA Testing of Cervicovaginal Specimens, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(4). April 2007

10. American Cancer Society, (2010) American Cancer Institute. Recent studies regarding VPH and cancer cervicouterino: Questions and answers. Disponible en: <http://cancernet.nci.nih.gov/cancertopics/factsheet/>. buscar
11. Aquino GJ. (2002). Utilización de la secuencia codificadora de la Subunidad B de la toxina Colérica (*Vibrio Cholerae* 01 El TOR) para potenciar la respuesta inmune mediada por una vacuna génica contra el VPH-16. Tesina de licenciatura UAM-1.
12. Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC. Structures of bovine and human papilloma virus. Analysis by cryoelectron microscopy and three- dimensional image reconstruction. *Biophys J.* 1991 Dec; 60(6): 1445-56.
13. BERMUDEZ A. (2005). Can we do the same in the developing world? *Gynecol Oncol* 99: S192-196.
14. William Burgos-Paz, Zoot; Carol Rosero-Galindo, Polomorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP'S) a partir de muestras de sangre almacenadas en tarjetas FTA para la especie *Cavia potcellus* Lin, *Rev Col Cienc Pec* Vol20:1,2007.
15. Francisco Perozo, Pedro Villegas, Iván Alvarado, Carlos Estévez, Sergio Rivera, Utilization of FTA® Cards for the Molecular Diagnostic of Newcastle Disease Virus in Allantoic Fluid Samples, *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XVI, Nº 2, 118 - 123, 2006*
16. A. Prieto, L.A. Cifuentes, R. Alfonso, J. Ortega, M. Camargo, Isolation of DNA using IsoCode cards, *International Congress Series 1288 (2006) 713– 715.*
17. Jackson DP, Bell S, Payne J, et al. Extraction and amplification of DNA from archival haematoxylin and eosin sections and cervical cytology Papanicolaou smears. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17:10134.
18. Poljak M, Seme K, Barlic J. Processing of long-stored archival Papanicolaou-stained cytological smears. *Br J Cancer.* 1996;74:1508-1509
19. -de Roda Husman AM, Snijders PJ, Stel HV, van den Brule AJ, Meijer CJ, Walboomers JM. Processing of long-stored archival cervical smears for human papillomavirus detection by the polymerase chain reaction. *Br J Cancer.* 1995 Aug;72(2):412-7

20. Sankaranarayanan R, Shyamalakumary B, Wesley R, et al. Visual inspection with acetic acid in the early detection of cervical cancer and precursors (Carta al editor). *Int J Cancer* 1999;80:161-163.
21. Ferenczy A, Franco E. Persistent human papilloma virus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol.* 2002;3:11-16.
22. Dr. Ludwig Ovalle, Dra. Silvia Palma, Dr. Pedro Rosales, MANUAL DE BOLSILLO Técnicas de Inspección Visual 13:2-29
23. Bulkman NWJ, L Rozendaal, FJ Voorhorst, PJF Snijders And CJLM Meijer, (2005) "Long-Term Protective Effect Of High-Risk Human Papillomavirus Testing In Population-Based Cervical Screening" *British Journal Of Cancer*; 92: 1800-1802
24. Drs. Coralia Carrillo Alessandro*, Gabriela López García *, Mireya González Blanco Lyadavina Caraballo*, Carolina Venegas, Detección del virus papiloma humano: influencia del tipo de muestra y la severidad de la lesión intraepitelial cervical, *Rev Obstet Ginecol Venez* 2010;70(4):240-248
25. Shibata D, Martin WJ, Arnheim N. Analysis of DNA sequences in forty years old paraffin-embedded sections: a bridge between molecular biology and classical. *Cancer Res* 1988; 48: 4564-6. [Links]
26. Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixation time. *Am J Clin Pathol* 1991; 95: 117-24
27. Norma Nacional, Reglas, Protocolos y procedimientos para la detección y control del cáncer del Cuello uterino 16
28. Picconi MA, Antonio LV, Carrancá y otros (2000) Molecular variants of human papillomavirus (VPH) types 16 and 18 in adenocarcinomas of the cervix. *Medicina (B Aires)*. 2000;60 (6):889-94.
29. Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the worldwide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer* 2002;97:72-81.
30. Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999;83:18-29.
31. Rama C. Roveli c, Mauricette S. Longatte A, Clementino R, Zanatta L, Etal. Prevalence of genital HPV infection among woman screened for cervical cancer.

32. Serman F(2002). Cancer cervicouterino: Epidemiologia, historia Natural y rol del Virus del Papiloma Humano. Perpectivas en prevención y tratamiento. Rev chil. Obste. Ginecol., 67(4):318-323.
33. Torrisi, A., a. Del Mistro, G. L. Onnis, F. Merlin, R. Bertorelle, and D. Minucci. Colposcopy, cytology and HPV-DNA testing in HIV-positive and HIV-negative women. Eur.J. Gynecol. Oncol. 2000, 21:168-172.
34. Rujano, N., □ Cruz, J.(octubre de 2010). Tesis: análisis de la forma integrada del ADN de VPH 18 en muestras genitales de pacientes con lesiones pre - neoplásicas y neoplásicas del Estado Merida- Venezuela. Merida, Venezuela: Universidad de los Andes, LABIOMEX
35. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM; Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 1999 Sep: 189(1);1-3
36. Alba Menéndez A. Técnicas de detección de VPH. Nuevas tecnologías. XVI Reunión de la AEPCC Alicante. Libro de ponencias 2004:63-6
37. Santos C. Cáncer de cérvix uterino en el Perú. Rev Méd 1994;1: 475.
38. Itziar Larizgoitia Diagnóstico precoz del cáncer cervical: conocimiento actual
 - a. sobre viejas y nuevas tecnologías 10-11
39. WHO/ICO HPV information centre Summary Report Update. September 15, 2010
40. Kavita Nanda et al., "Accuracy of the Papanicolaou Test in screening for and followup of Cervical Cytologic Abnormalities: A Systematic Review", Annals of Internal Medicine 132, nº 10: 810-19. 2000.
41. Agency for Health Care Policy and Research (AHCPR). Evaluation of cervical Cytology. Evidence Report/Technology Assessment, Nº 5. Rockville, MD. (1999).
42. S. Bonin, F. Petrera, B. Niccolini, G. Stanta, pcr analysis in archival post-mortem tissue, Mol. Pathol., 56, 84 (2003).
43. C.M. Pusch, I. Giddings, M. Scholz, Repair of degraded duplex adn from prehistoric samples using Escherichia coli adn polymerase I and T4 adn ligase, Nucleic Acids Res., 26, 857 (1998).
44. ROGERS, C.; BURGOYNE, L. "Reverse transcription of an RNA genome from databasing paper (FTA). Biotechnol Appl Biochem. 31 (Pt3): 219-224.200.

45. Jordi Ponce i Sebastia Infección por el virus del papiloma humano (VPH) Prog Obstet Ginecol 2001;44:289-323.
46. Feng Qinghua ^{1,*} Stephen Cherne ¹ Rachel L. Winer ² Viorica Popov ¹ Héctor Zambrano ³ Carlos Yerovi ⁴ Stephen E. Hawes ² Laura A. Koutsky ² y Nancy B. Kiviat ¹ Evaluation of Transported Dry and Wet Cervical Exfoliated Samples for Detection of Human Papillomavirus Infection. Journal Clinical Microbiology de septiembre de 2010; 48 (9):3.068 a 3.072.
47. SMITH, L.; BURGOYNE, L. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA databasing paper. BMC Ecol 4(1): 4. 2004.
48. Roda Husman AM, walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP 6 elongated at their 3_ ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. J Gen Virol 1995;76: 1075 – 62.
49. Kleter _B, van Doorn LJ, ter Schegget J, Scharauwen L, van Krimpen K, Burger M, ter Harmsel B, Quint W. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomavirus. Am J Paathol. 1998 Dec; 153(6):1731-9.
50. P. E. GRAVITT,^{1*} C. L. PEYTON,² T. Q. ALESSI,² C. M. WHEELER,² F. COUTLEE,³ A. HILDESHEIM,⁴ M. H. SCHIFFMAN,⁴ D. R. SCOTT,⁵ AND R. J. APPLE,¹ Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses, Journal of Clinical Microbiology, Jan. 2000, p. 357-361.
51. Preparación de muestras de ácido nucleico y proteína, FTA, FTA Elute p;259.
52. Lewin, B. El extraordinario poder de la tecnología del DNA. En Reverte (Ed). Genes. 3ª ed, B. Lewin, Barcelona 1991; 379-393.
53. Nuovo, G.J. In situ hybridization. En: Raven Press (Ed.). PCR in situ hybridization. Protocols and Applications. GJ. Nuovo, Nueva York 1994; 100-168.
54. Cañadas M, Lloveras B, Lorincz A, Ejarque M, Font R, Bosch F, et al. Evaluación de las técnicas de detección del VPH en los programas de cribado para cáncer de cuello uterino. Salud Pública Méx. 2006; 48:373-378.
55. Z. De Guglielmo, A. Rodríguez Métodos utilizados en la identificación del virus de papiloma humano An. Sist. Saint. Navar:33(1): 71-77.

ANEXOS

ANEXO 1

FORMULARIO DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA
(IIBISMED)

Yome he informado y he comprendido el propósito y objetivos de este proyecto de Investigación. He podido realizar preguntas sobre el mismo (detección, diagnóstico y seguimiento de las lesiones precursoras del cáncer cérvico uterino y del virus del papiloma humano), también he recibido una explicación sobre los beneficios de esta investigación, por lo que mi participación es voluntaria.

Se me ha dado a conocer que los datos y resultados serán manejados con discreción y respeto a mi intimidad, por lo que acepto participar en este estudio.

Declaro conocer el contenido del presente documento; por lo tanto acepto y asumo el compromiso, y como constancia firmo el presente voluntariamente.

Firma o huella digital de la paciente

Edad de la paciente:

Cochabamba,...../...../20....

ANEXO 4

EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE MUESTRAS DE LAMINAS DE PAP

Materiales y Equipos:

- Cepillos cervicales
- Láminas de vidrio (porta objetos)
- Pipetas
- Tips
- Centrifuga
- Tampón PK – 1

Toma de muestras de células cervicales con cepillo cervical

- Realizar un cepillado, ya sea con cepillo local provisto por el programa de salud o cepillos cervicales
- Aplicar sobre la lámina de porta objeto
- Dejar secar a temperatura ambiente
- Llevar al laboratorio de HPV de IIBISMED

Extracción del ADN de muestras obtenidas de PAP

- Utilizar por muestras un tubo de eppendorf de 1,5 ml con 250 ul de tampón PK
- Añadir unas cuantas gotas de tampón PK-1 sobre lugar donde se va a raspar
- Raspar con una hoja de bisturí estéril en la región humeda
- Agrupar el material sobre una esquina de la lamina y dejar resbalar el liquido en el eppendorf
- Mezclar el tubo varias veces
- Incubar a 56°C toda la noche
- Inactivar la proteinasa K mediante incubación de 10 min a 100 °C bloque de calefacción (calentando)
- Centrifugar 10 minutos a 14.000 rpm

ANEXO 5

EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE MUESTRAS OBTENIDAS EN TARJETAS FTA

Materiales y Equipos:

- Pipetas
- Tips
- Vortex
- Agua Esteril
- Placa de Calentamiento
- Corta Punzante
- Tubos de Eppendorf 1,5 ml

Toma de muestras de células cervicales con cepillo cervical

- Realizar un cepillado, ya sea con cepillo local provisto por el programa
- Aplicar presionando sobre el papel
- Dejar secar a temperatura ambiente por 2 horas
- Llevar al laboratorio de VPH –VIH de IIBISMED

Extracción del ADN de muestras obtenidas de PAP

- Cortar 3 mm y depositar a los tubos de Epepdorf de 1,5 ml
- Lavado con 500 ul de agua esteril
- Vortexear 3 veces por 5 segundos
- Transferir el disco a otro tubo de eppendorf
- Colocar 60 ul de agua esteril
- Inactivar la proteinasa K mediante incubación de 30 min a 98°C bloque de calefacción (calentando)
- Vortexear 30 veces aproximadamente por un segundo
- Descartar el disco y conservar 1' ADN a -20 °C.

ANEXO 6
PROTOCOLO DE CEPILLADO CERVICAL EN MUESTRAS OBTENIDAS EN
PAPEL FTA

Materiales y Equipos:

- Pipetas
- Tips
- Vortex
- Agua Esteril
- Placa de Calentamiento
- Corta Punzante
- Tubos de Eppendorf 1,5 ml

Toma de muestras de células cervicales con cepillo cervical

- Realizar un cepillado, ya sea con cepillo local provisto por el programa
- Aplicar presionando sobre el papel
- Dejar secar a temperatura ambiente por 2 horas
- Llevar al laboratorio de HPV –VIH de IIBISMED

Extracción del ADN de muestras obtenidas de PAP

- Corta 3 mm y depositar a los tubos de Epepdorf de 1,5 ml
- Lavado con 500 ul de agua esteril
- Vortexear 3 veces por 5 segundos
- Transferir el disco a otro tubo de eppendorf
- Colocar 60 ul de agua esteril
- Inactivar la proteinasa K mediante incubación de 30 min a 98°C bloque de calefacción (calentando)
- Vortexear 30 veces aproximadamente por un segundo
- Descartar el disco
- Conservar 1' ADN a -20 °C.

ANEXO 7

PRIMERS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE la β - globina

Tipo de primer	Primer	Secuencia (5'- 3')	Tamaño (pb)	Referencia
GH 20	Pr 1	3' GAA-GAG-CCA-AGG-ACA-GGT-AC 5'	268	Saiki et al 1985.
PC 04	Pr 2	3' CAA-CTT-CAT-CCA-CGT-TCA-CC 5'		

ANEXO 8

PRIMERS PGMY 09/11 UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO CORRESPONDIENTE AL GEN L1 DEL VPH.

Primers para PGMY 09/11			
1	PGMY 11 A_G494	FW	5'-gCACAgggACATAACAATgg3'
2	PGMY 11 B_G495	FW	5'-gCgCAgggCCACAATAATgg3'
3	PGMY 11 C_G496	FW	5'-gCACAgggACATAATAATgg3'
4	PGMY 11 D_G497	FW	5'-gCCCAGggCCACAACAATgg3'
5	PGMY 11 E_G498	FW	5'-gCTCAgggTTTAAACAATgg3'
6	PGMY 11 F_G499	Rev	5'-CgTCCCAAaggAAACTgAT3'
7	PGMY 11 G_G500	Rev	5'-CgACCTAAaggAAACTGAT3'
8	PGMY 11 H_G501	Rev	5'-CgTCCCAAAGGAAACTgATC3'
9	PGMY 11 I_G502	Rev	5'-gCCAaggggAAACTgATC3'
10	PGMY 11 J_G503	Rev	5' CgTCCCAAAGGATACTGATC3'
11	PGMY 11 K_G504	Rev	5' CgTCCAAggggATACTGATC3'
12	PGMY 11 L_G505	Rev	5'CgACCTAAaggAATTgATC3'
13	PGMY 11 M_G506	Rev	5'CgACCTAggTTgATC3'
14	PGMY 11 N_G507	Rev	5'CgACCAaggggATATTgATC3'
15	PGMY 11 P_G508	Rev	5'-gCCCAACggAAACTgATC3'
16	PGMY 11 Q_G509	Rev	5'CgCCCAagggAAATCTggTC3'
17	PGMY 11 R_G510	Rev	5'CgTCCTAAAGGAAACTGGTC3'
18	HMB01_G511	Rev	5'-gCgACCCAATgCAAATTggT3'

ANEXO 9

Medidas de concordancia Índice de Kappa

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

ANEXO 10

RESULTADO DE CITOLOGÍA CERVICO VAGINAL (HOSPITAL MATERNO INFANTIL GERMÁN URQUIDI)



HOSPITAL MATERNO INFANTIL "GERMÁN URQUIDI" LABORATORIO DE
CITOLOGÍA

Nombres y Apellidos:.....

Reg. Lab. N°:..... Fecha de Solicitud: Fecha de Reporte:

Médico Solicitante:..... Red: Municipio: *Cercado* Establecimiento:

N° de Seguro:..... N° HCl: Edad:.....

Localidad: Subsector:.....

RESULTADO DE CITOLOGÍA CERVICO VAGINAL

CALIDAD DE LA MUESTRA

Con adecuado componente endocervical/zona de transformación Satisfactoria

Sin componente endocervical/zona de transformación

Satisfactoria, pero.....

Muestra procesada y examinada, no rechazada

Insatisfactoria. Rechazada por

TROPISMO CELULAR Y EVALUACIÓN HORMONAL

Predominio de células basales y para basales

Predominio de células intermedias

Predominio de células superficiales

Valoración hormonal perjudicada por:.....

Negativo para Lesión Intraepitelial o Malignidad. Sin anomalías en células epiteliales

Negativo para Lesión Intraepitelial o Malignidad. Cambios Celulares Reactivos

Asociados con Inflamación.

Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado (ASC-US)

Células Escamosas Atípicas: No se puede excluir Lesión Intraepitelial Escamosa

de Alto Grado (ASC-H)

Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado LIE-BG

Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado LEE-AG

Carcinoma de células escamosas

Adenocarcinoma Endocervical

Adenocarcinoma Endometrial

Células glandulares Endocervicales atípicas

Células glandulares Endocervicales atípicas probablemente neoplásicas

Adenocarcinoma Endocervical "EN SITU"

OTROS HALLAZGOS NO NEOPLASICOS:

MICROORGANISMOS

Cocos - Bacilos cortos

Trichomona Vaginales

Hongos, organismos morfológicamente compatibles con *Cándida* SSP.

Cambio en la flora, sugerente de Vaginosis *Gardnerella* Vaginalis

Actinomyces

Virus Herpes Simple

Clamidia SSP

Cambios celulares por HPV

COMENTARIOS Y SUGERENCIAS:

Firma de Responsable

