

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

VIRUS PAPILOMA HUMANO (HPV) Y CÁNCER DE CUELLO UTERINO: ESTUDIO DE LOS GENOTIPOS Y LA EXPRESIÓN DE LA ONCOPROTEÍNA VIRAL E6 EN LESIONES DE DISTINTA GRAVEDAD

Colucci, María Celeste - LU: 1075464

Licenciatura en Biotecnología

Tutora:

Dra. Correa, Rita Mariel

Servicio Virus Oncogénicos

Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - ANLIS “Dr. Malbrán”

Co-Tutor:

Dr. Crivaro, Luis Pablo Andrés

Universidad Argentina De la Empresa

Marzo 4, 2021



UADE

**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

AGRADECIMIENTOS

A pesar del esfuerzo realizado en este largo recorrido, muchas cosas hubieran sido imposibles sin el apoyo y ayuda de personas a quienes quiero profundamente, por eso quiero agradecerle especialmente a:

- A mis padres, Silvia y Jorge. Gracias por guiarme y hacer de mí la persona que soy, gracias por acompañarme siempre, por bancar y alentar en cada momento de la vida.
 - A mi tía gracias por mostrarme el maravilloso mundo de la ciencia, sos guía y ejemplo para mí.
 - A mi hermano gracias por ser ejemplo de perseverancia.
 - Gracias a José, por las cenas a largas horas de la noche, por aguantar de la mejor manera los malos humores y nervios. Gracias por darme lo más maravilloso de nuestras vidas. Te amo.
 - ¡A mis gatos! Simón, la compañía perfecta en una mañana de estudio, y León, el insistente para jugar y tomarse recreos las 24 hs. del día.
 - Gracias a mis compañeros y ex compañeros del Servicio Virus Oncogénicos (INEI - ANLIS “Malbrán”). A Mariel por tanta paciencia, dedicación, ayuda e insistencia. Alejandra, muchísimas gracias por la oportunidad de lograr un trabajo tan lindo como este, gracias por la confianza y responsabilidades que me das en cada nuevo proyecto. Gracias a Joaquín, por enseñarme, guiarme y por confiar en mí. Gracias a Cris, Dolo, Flor, Ginette, Jorge, Kari, Silvi, Sofi y Vale. Es un orgullo trabajar codo a codo con todos ustedes, que me alienten y me apoyen.
 - Gracias a mi querido Instituto Malbrán que me ve crecer personal y profesionalmente desde mis 18 años entre sus jardines y laboratorios. Gracias a las personas que engrandecen al Instituto y hacen de este un lugar maravilloso al cual ir alegre a trabajar cada día, en especial no quiero dejar de nombrar a: Las Mónicas, Leo, Mariela, Las Cecilias y Celeste.
-

- Quisiera destacar un fuerte reconocimiento para el grupo internacional del proyecto ESTAMPA liderado por Maribel Almonte y Rolando Herrero (IARC-OMS), en especial para los colegas de los Servicios de Ginecología y Anatomía Patológica del Hospital Nacional “Prof. Posadas”. La intensa y fructífera interacción multidisciplinaria significó un valioso aporte a mi formación y al presente trabajo.
- Imposible no agradecer a las personas increíbles que conocí en la facultad, y a quienes con orgullo podré llamar colegas: Flor L, Flor Z, Juan, Naty, Pablo, Ro, Santi y Tomi, gracias por las cursadas, los mates, los recreos, los apuntes, las explicaciones, los TPs, las risas, etc. sin ustedes este camino hubiese sido mucho más duro y largo.
- Gracias a Luis Crivaro, un docente que realmente busca transmitir con pasión sus conocimientos a los alumnos, gracias por la dedicación, el aliento y acompañar durante el proceso de esta tesis.
- A mis amigas de toda la vida: Anto, Flor y Nadita, la fuente de motivación constante para no bajar los brazos jamás.
- Al básquet, descarga de tensiones en los momentos más oportunos, el deporte que me dio características invaluable de mi personalidad, y que fue dejando a su paso amigas para toda la vida: Any, Brem, Caro y mi querido grupo de WhatsApp: “Decile Mamá!”
- No puedo dejar de destacar que la realización de esta tesis fue apoyada en parte, por el Instituto Nacional del Cáncer otorgándome la “beca de investigación 2019 como estudiante avanzado”.

Para finalizar y valiéndome de que los últimos serán los primeros, gracias a mis abuelos Juan y Esther a quienes extraño profundamente, y a Roma, la dueña de la sonrisa que detiene el tiempo y me derrite de amor. Gracias por ser inspiración, motivo y fuente de energía para concluir esta etapa.

CONTENIDOS

ABREVIATURAS	III
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Genoma y estructura del virus papiloma humano	3
1.2. Taxonomía	4
1.3. Patogenia	6
1.4. Historia natural de la infección por HPV	7
1.5. El HPV en la etiología del cáncer de cuello uterino.....	10
1.6. Potencial oncogénico viral.....	11
1.7. Epidemiología de la infección por HPV	14
1.8. Prevención	16
1.8.1. Prevención primaria: Vacunas	16
1.8.2. Prevención secundaria: Tamizaje poblacional.....	18
1.9. Detección de HPV	20
1.9.1. Detección de ADN viral	21
1.9.2. Detección de la oncoproteína viral E6.....	22
1.10. Evaluación de pruebas para triage: variables a considerar	23
1.11. Proyecto ESTAMPA.....	25
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. Objetivo general	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
2.3. Hipótesis	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. Comité de ética	28
3.2. Diseño, población y muestras	28
3.2.1. Diseño del estudio	28
3.2.2. Población.....	29
3.2.3. Muestras	32

3.3. Parte experimental	33
3.3.1. Toma de muestras	33
3.3.2. Detección y genotipificación de HPV	34
3.3.2.1. Extracción de ADN	34
3.3.2.2. Detección de HPV	35
3.3.2.3. Genotipificación de HPV por PCR-hibridación reversa	36
3.3.3. Detección de la oncoproteína E6 de HPV16/18.....	39
3.3.4. Análisis estadístico.....	41
4. RESULTADOS	42
4.1. Genotipificación de HPV por PCR-hibridación reversa.....	42
4.2. Detección de la oncoproteína E6 de HPV16/18 y análisis de validez en la prueba de triage.....	45
5. DISCUSIÓN.....	48
6. CONCLUSIONES.....	54
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	55
8. BIBLIOGRAFÍA.....	56
9. ANEXOS.....	64
9.1. Anexo 1: Resolución del comité de ética	64
9.2. Anexo 2: Consentimiento informado.	65
9.3. Anexo 3: Listado de <i>primers</i> BSGP5+/6+ ^{Biot}	69
9.4. Anexo 4: Listado de oligosondas tipo-especificas utilizadas para la genotipificación	70
9.5. Anexo 5: Guía rápida OncoE6 TM Cervical Test	72

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNbc	ADN circular de doble cadena
AGC	Células glandulares atípicas no específicas
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ASC-H	Células escamosas atípicas donde no es posibles descartar LIEAG
ASC-US	Células escamosas atípicas de importancia no determinada
CCU	Cáncer de cuello uterino
CH2	Captura de híbridos 2
CN	Control negativo
CP	Control positivo
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EDAC	<i>N</i> -Etil- <i>N'</i> -(3-dimetilaminopropil)carbamida hidrocioridro
EDTA	Ácido etilendiamintetra-acético
EMA	Agencia Europea de Medicamentos; del inglés <i>European Medicines Agency</i>
ESTAMPA	Estudio multicéntrico de tamizaje y triage de cáncer de cuello uterino usando pruebas del virus papiloma humano
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos; del inglés <i>Food and Drug Administration</i>
FN	Falso negativo
FP	Falso positivo
HPV	Virus del papiloma humano; del inglés <i>human papiloma virus</i>
HPV-AR	HPV de alto riesgo
HPV-BR	HPV de bajo riesgo
HPV-PAR	HPV probable alto riesgo
IARC	Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer; del inglés <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC	Intervalo de confianza
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de los Virus ;del inglés <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>

IDH	Índice de desarrollo humano
IM	Infección múltiple
INC	Instituto Nacional del Cáncer
INEI	Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas
IS	Infección simple
ITS	Infección de transmisión sexual
LCR	Región larga de control; del inglés <i>Long Control Region</i>
LIEAG	Lesión intraepitelial escamosa de alto grado
LIEBG	Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado
mAb	Anticuerpos monoclonales
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ND	No detectable
NIC 1	Neoplasia intraepitelial cervical grado 1
NIC 2	Neoplasia intraepitelial cervical grado 2
NIC 3	Neoplasia intraepitelial cervical grado 3
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco de lectura abierto; del inglés <i>Open Reading Frame</i>
p53	Proteína supresora de tumores.
PA	Fosfatasa alcalina
pb	Pares de bases
PBS	Buffer de fosfato salino
PC	PreservCyt
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-RLB	PCR combinada con Hibridación Reversa en línea; inglés <i>Reverse Line Blotting</i>
pH	Potencial de hidrogeno
pmol	Picomol
PNPCC	Programa Nacional de Prevención de Cáncer Cérvico-uterino
POE	Procedimiento de operación estándar
pRb	Proteína del retinoblastoma

PV	<i>Papilomavirus</i>
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; del inglés <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RLB	Hibridación Reversa en línea, del inglés <i>Reverse Line Blotting</i>
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SSPE	Buffer EDTA-ClNa- Fosfatos
TAE	Tasas ajustadas por edad
U	unidades
UV	Ultravioleta
Vf	Volumen final
VLP	Partículas semejantes a virus; del inglés <i>Virus Like Particles</i>
VN	Verdadero negativo
VP	Verdadero positivo
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
ZT	Zona de transformación
≤LIEBG	Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado y normales
≥LIEAG	Lesión intraepitelial escamosa de alto grado y cáncer
°C	Grados Celsius
μl	Microlitros

RESUMEN

El cáncer de cuello uterino (CCU) es consecuencia de la infección persistente por el virus papiloma humano de alto riesgo oncogénico (HPV-AR). En Argentina se reportan alrededor de 4.500 nuevos casos por año y cerca de la mitad de las pacientes mueren a causa de esta enfermedad, a pesar de ser prevenible mediante vacunación y tamizaje.

La prueba de detección de ADN de HPV-AR ha mostrado ser mejor que la citología como método de tamizaje dada su mayor sensibilidad y alto valor predictivo negativo; pero su menor especificidad podría generar un gran número de mujeres que requieran evaluaciones adicionales para confirmación de enfermedad, lo que sería ineficiente e insostenible para el sistema de salud. Una prueba de triage evitaría esta situación.

En este trabajo se plantea identificar los genotipos de HPV e investigar la expresión de la oncoproteína viral E6 de los HPV-AR tipos 16 y 18, en lesiones de distinta gravedad, como posible prueba de triage.

Se realizó un estudio transversal en 510 pacientes con diversos diagnósticos citohistológico con HPV-AR positivo en el tamizaje. La genotipificación de HPV se hizo mediante PCR con posterior hibridación reversa, que permite identificar 36 genotipos de HPV-AR y bajo riesgo oncogénico (HPV-BR), presentes en infecciones simples o múltiples. La determinación de la oncoproteína E6 se realizó en un subgrupo de 114 casos positivos para HPV16 y/o 18, con citologías normales y distintos grados de lesión, empleándose un ensayo de flujo lateral.

En pacientes con citología normal y lesiones de bajo grado se identificó una gran diversidad de HPV-AR y HPV-BR, siendo el HPV16 (19,9%) el más frecuente. Mientras que en las lesiones de alto grado, el espectro viral se restringió, con franco predominio de los HPV-AR, en especial HPV16 (63,2%), seguido por HPV31, 58 y 18 (98,5%). La evaluación de la oncoproteína E6, dio una sensibilidad general de 93,3% (95%IC: 82,1-97,7) y especificidad de 66,7% (95%IC: 54,9-76,6), lo que conlleva a un valor predictivo positivo de 64,6% (95%IC: 52,5-75,1).

En conclusión, el estudio permitió construir una línea basal de prevalencia tipo-específica en mujeres con y sin lesión que servirá para la futura medición del impacto de las vacunas contra el HPV en esta población. La alta especificidad obtenida para la prueba OncoE6, suma evidencia a favor de su uso en el triage de mujeres HPV positivas en el tamizaje, significando una novedosa herramienta para optimizar la prevención secundaria del CCU.

ABSTRACT

Cervical cancer (CC) is a rare consequence of persistent infection by the human papillomavirus with high oncogenic risk (HR-HPV). In Argentina, around 4,500 new cases are reported per year and about half of the patients die from this disease, despite being preventable through vaccination and screening.

The HPV-HR DNA detection test has been shown to be better than cytology as a screening method given its greater sensitivity and high negative predictive value; however, its lower specificity could generate a large number of women who require additional evaluations to confirm the disease, which would be inefficient and unsustainable for the health system. A triage test would avoid this situation.

In this research, it is proposed to identify HPV genotypes and investigate the expression of the viral oncoprotein E6 of HPV-HR types 16 and 18, in lesions of different severity, as a possible test for triage.

A cross-sectional study was conducted in 510 patients with various cyto-histological diagnoses with positive HPV-HR on screening. HPV genotyping was done by PCR with subsequent reverse blotting, which allows the identification of 36 HPV-HR genotypes and low oncogenic risk (HPV-LR), present in single or multiple infections. The determination of the E6 oncoprotein was carried out in a subgroup of 114 positive cases for HPV16 and/or 18, with normal cytologies and different degrees of disease, using a lateral flow assay.

In patients with normal cytology and low-grade lesions, a great diversity of HPV-HR and HPV-LR was identified, with HPV16 (19.9%) being the most frequent. While in high grade lesions, the viral spectrum was restricted, with a clear predominance of HPV-HR, especially HPV16 (63.2%), followed by HPV31, 58 and 18 (98.5%). The evaluation of the E6 oncoprotein, gave a general sensitivity of 93.3% (95% CI: 82.1-97.7) and specificity of 66.7% (95% CI: 54.9-76.6), which leads to a positive predictive value of 64.6% (95% CI: 52.5-75.1).

In conclusion, the study allowed the construction of a baseline of type-specific prevalence in women with and without disease that will serve for the future measurement of the impact of HPV vaccines in this population. The high specificity obtained for the OncoE6 test adds evidence in favor of its use in the triage of HPV positive women in screening, meaning a novel tool to optimize the secondary prevention of CCU.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Genoma y estructura del virus papiloma humano

Los virus de la familia *Papillomaviridae*, son virus pequeños, de aproximadamente 55 nm de diámetro. Están formados por un genoma de ADN circular de doble cadena (ADNbc) superenrollado de aproximadamente 8.000 pares de base (pb) asociado a histonas, contenido en una cápside icosaédrica desnuda compuesta por 72 cápsomeros pentaméricos (Fields et al., 2007).

El genoma de los Papilomavirus (PV) contiene aproximadamente 8 marcos abiertos de lectura (ORF, del inglés *Open Reading Frame*) que son todos transcritos a partir de una única hebra de ADN (Fields et al., 2007). El genoma puede dividirse en 3 partes funcionales: una que codifica para proteínas tempranas (del inglés, *Early*), necesarias para la replicación viral (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7), otra región que codifica para dos proteínas tardías o L (del inglés, *Late*) (L1 y L2) requeridas para el ensamblado del virión, y una región larga no codificante (LCR del inglés, *Long Control Region*) que contiene elementos en *cis* necesarios para la replicación y transcripción del ADN viral.

Tres proteínas tempranas del virus, E5, E6 y E7, son oncoproteínas que estimulan la proliferación celular, la supervivencia celular y modulan la diferenciación de los queratinocitos (Syrjänen and Syrjänen, 1999).

Las proteínas E1 y E2 actúan como factores que reconocen el origen de la replicación; la proteína E2 es también el principal regulador de la transcripción del gen viral. Se cree que E4, a pesar de su nombre, está involucrado en las últimas etapas del ciclo de vida del virus y E5 puede funcionar durante las fases iniciales y tardías. Las proteínas E6 y E7 se dirigen a varios reguladores negativos del ciclo celular, principalmente pRb (proteína del retinoblastoma) y p53 (proteína supresora de tumores), respectivamente. Durante el ciclo de vida viral, E6 y E7 facilitan el mantenimiento estable de los episomas virales y estimulan las células diferenciadoras para que vuelvan a entrar en la fase S. Las proteínas tardías L1 y L2 se ensamblan en cápsomeros, que forman cápsides icosaédricas alrededor del genoma viral durante la generación de viriones de progenie (IARC, 2007).

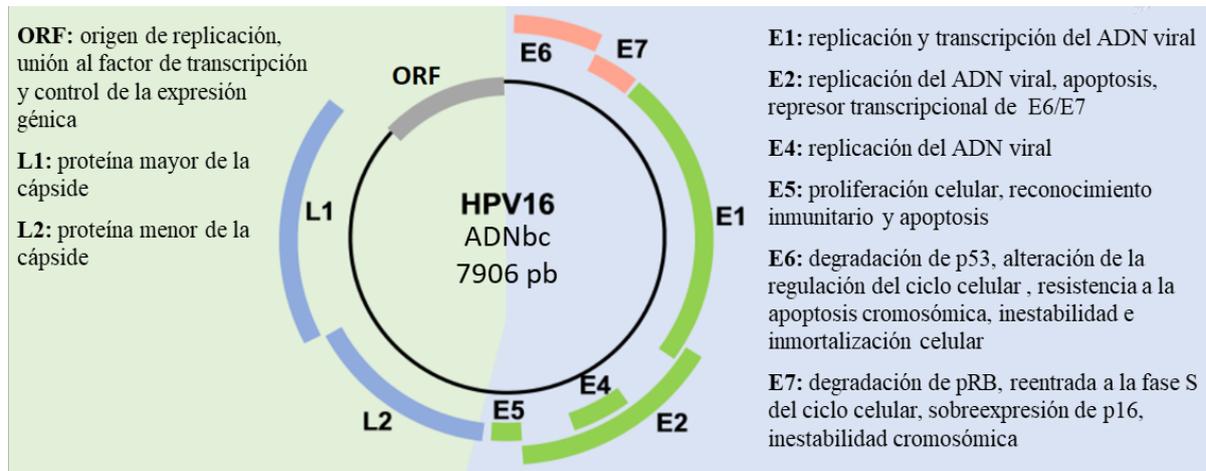


Figura 1: Organización genómica del HPV16 y las principales funciones de las proteínas virales. El esquema representa el ADN de doble cadena circular. E:proteínas tempranas, L:proteínas tardías (Adaptado de de Sanjosé, Brotons, Pavón 2018)

1.2. Taxonomía

En el año 2004, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, del inglés, *International Committee on Taxonomy of Viruses*) reconoció formalmente a la familia *Papillomaviridae* (Bernard et al., 2010; de Villiers et al., 2004).

Actualmente, existen más de 200 PV que infectan humanos (Karolinska Institutet, 2020), y se continúan estudiando y secuenciando nuevos candidatos. Los PV se nombran de acuerdo al hospedador que infectan; así, el HPV (del inglés, *human papiloma virus*), es el virus que infecta al humano, el BPV (del inglés, *bovine papiloma virus*), es el virus que infecta al bovino, etc.

La clasificación taxonómica incluye géneros (nombrados con letras griegas), especies (nombrados con números arábigos), tipos (nombrados con números arábigos), subtipos (nombrados con letras minúsculas), y variantes. La clasificación se basa en la diferencia de una de las regiones más conservadas del genoma viral, el ORF que codifica para la proteína de la cápside L1 (de Villiers et al., 2004). Cuando se comparan las secuencias de un alto número de PV uno puede observar la formación de un árbol filogenético, figura 2.

Los distintos géneros de PV presentan una variación dentro de la región L1 del genoma viral de más del 40%. Para la clasificación en diferentes especies virales, se debe encontrar un porcentaje de variación entre el 30 y 40% en la misma región. El tipo viral se

define como un genoma completo secuenciado cuya secuencia nucleotídica difiere en la región L1 de cualquier otro en al menos un 10%. Si la variación en la secuencia de nucleótidos se encuentra entre 2-10% se considera un sub-tipo viral y si esta entre 0,5-2% es considerado una variante intratípica (Bernard et al., 2010, 2006; Van Doorslaer et al., 2011).

Los tipos de HPV que se encuentran en los seres humanos tanto mucosos como cutáneos, se clasifican en 5 géneros: α -papillomavirus, β -papillomavirus, γ -papillomavirus, μ -papillomavirus y ν -papillomavirus (de Villiers et al., 2004).

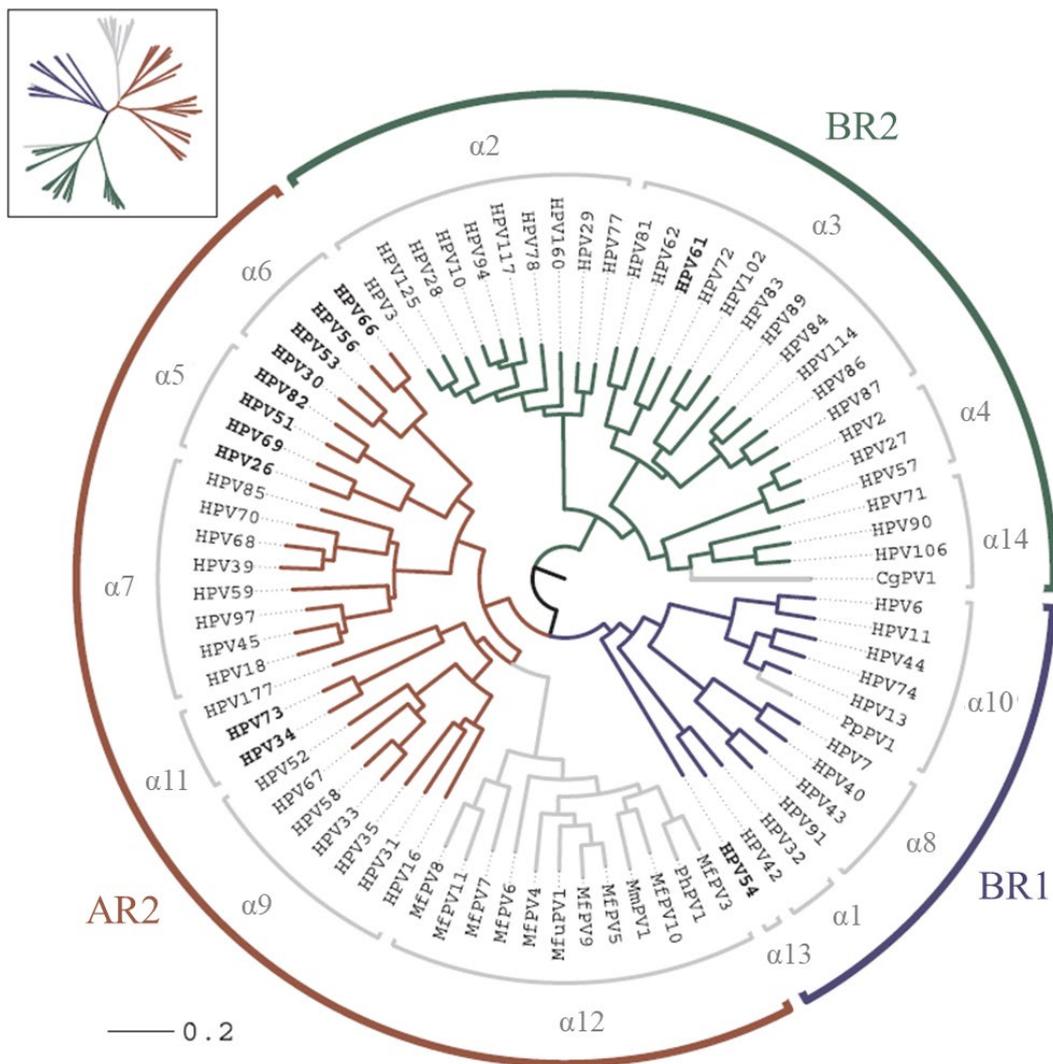


Figura 2: Árbol filogenético del virus del α -papiloma. Los números justo dentro de los corchetes exteriores representan los grupos de especies (por ejemplo, $\alpha 6$ contiene HPV30, 53, 56 y 66). Las variantes de tipo HPV presentes se indican en negrita. Los tipos unidos por líneas grises representan PV de primates no humanos dentro de los α -papilomavirus. AR: alto riesgo; BR: bajo riesgo. (Adaptado de Chen et al., 2018)

1.3. Patogenia

La infección por HPV es muy común y puede afectar tanto la piel como las mucosas, mostrando una especial predilección por células del epitelio escamoso, columnar, cuboidal o de los epitelios de transición (Münger et al., 2004; Schiffman et al., 2007).

Los HPV que infectan la mucosa del tracto genital se han clasificado en tres grupos según su potencial oncogénico: HPV de alto riesgo (HPV-AR) que se asocian con el desarrollo de cáncer de cuello uterino (CCU) y otros cánceres genitales, HPV de probable alto riesgo oncogénico (HPV-PAR), cuyo potencial carcinogénico está en evaluación, y HPV de bajo riesgo (HPV-BR) comúnmente presentes en lesiones benignas, como verrugas genitales o condilomas, con mínimo riesgo de progresión maligna (tabla I) (Castle et al., 2010; Muñoz et al., 2006, 2003).

<i>HPV Alto riesgo</i>	<i>HPV Probable alto riesgo</i>	<i>HPV Bajo riesgo</i>
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	26, 53, 66, 68, 73, 82	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89

Tabla I: Clasificación de los HPV mucosotropos de acuerdo a su potencial oncogénico (Castle et al., 2010; Muñoz et al., 2006, 2003).

La transmisión del virus se produce por contacto directo con la piel o las mucosas infectadas, a través de traumas y microabrasiones del epitelio. En el caso de los HPV anogenitales, la infección se produce principalmente por contacto sexual (Bosch et al., 2008; Doorbar, 2007; Stanley, 2012).

La infección por HPV está asociada etiológicamente a los cánceres de cuello uterino; también se vincula con el desarrollo de neoplasias extracervicales, tales como: cáncer vulvar ($\approx 50\%$), cáncer vaginal ($\approx 65\%$), cáncer de pene ($\approx 40\%$), cáncer anal ($\approx 95\%$) y neoplasias extragenitales como los cánceres de cabeza y cuello, particularmente los orofaríngeos ($\approx 60\%$) (CDC, 2020).

1.4. Historia natural de la infección por HPV

La infección genital por HPV es una de las infecciones de transmisión sexual (ITS) más frecuentes. Se estima que un 80% de las mujeres y hombres se infectarán con uno o varios genotipos de HPV a lo largo de sus vidas. Los principales factores de riesgo de infección son la edad temprana de inicio de relaciones sexuales, el número de parejas sexuales y su conducta sexual (de Sanjosé et al., 2018a).

Dadas las características replicativas del virus; el lugar anatómico y fisiológico preferido para el asiento de las lesiones inducidas por HPV es la zona del cuello uterino, sitio en el que se unen el epitelio columnar mucosecretor del endocervix y el epitelio escamoso estratificado, denominada zona de transformación (ZT) (figura 3). Esto se debe a que en esta zona de transformación, un tipo de epitelio reemplaza al otro a través de un proceso denominado metaplasia, involucrando una activa mitosis celular que favorece al ciclo de vida del virus (Burd, 2003; Schiffman et al., 2007).

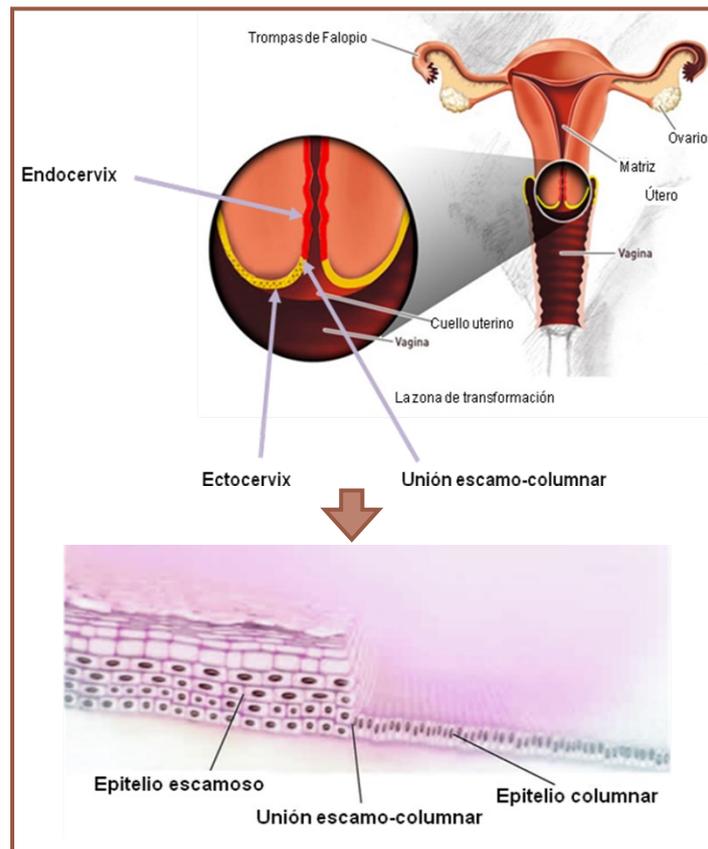


Figura 3: Localización del cuello uterino (parte superior) y esquema detallado de la unión escamo-columnar (parte inferior) (Adaptado de: Herfs et al., 2013)

Durante la infección productiva en las células cervicales pueden observarse cambios morfológicos leves a moderados inducidos por el virus, que se asocian con la neoplasia intraepitelial cervical grado 1 (NIC1), también llamadas lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIEBG). Las infecciones persistentes concentran el foco de la atención ya que tienen una elevada probabilidad de avanzar a neoplasias intraepiteliales cervicales grado 2 y 3 (NIC2, NIC3), que juntas forman parte del grupo también conocido como lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIEAG), precursoras del CCU. Se estima que el tiempo necesario para alcanzar esta progresión a CCU, en caso de permanecer sin tratamiento, es de varios años, pudiendo superar una década. Esta situación ocurre preferentemente en las mujeres mayores de 30 años; por esta razón, los programas de tamizaje están dirigidos en especial a este grupo etario, con el fin de identificar a las mujeres portadoras de LIEAG que son lesiones tratables y curables (figura 4) (Stoler, 2000).

Microscópicamente la evolución de la neoplasia intraepitelial cervical se caracteriza por la diferenciación de las células epiteliales que progresivamente proliferan e invaden el espesor del epitelio. Para la clasificación de cada una de estas lesiones se evalúan anomalías tales como, la mayor relación núcleo/citoplasma, la hipercromasia, el polimorfismo y la variación del tamaño nuclear. A menudo existe una fuerte correlación entre la proporción del epitelio que presenta maduración y el grado de anomalía nuclear. En un epitelio normal las células mitóticas en división son poco frecuentes, y de existir se encuentran solo en la capa basal. Conforme se incrementa la gravedad de la neoplasia intraepitelial cervical aumenta el número de células mitóticas, que pueden verse en las capas epiteliales superficiales. Cuanto menos diferenciado es un epitelio, más alto es el nivel en que pueden verse figuras mitóticas (Zsemlye, 2013).

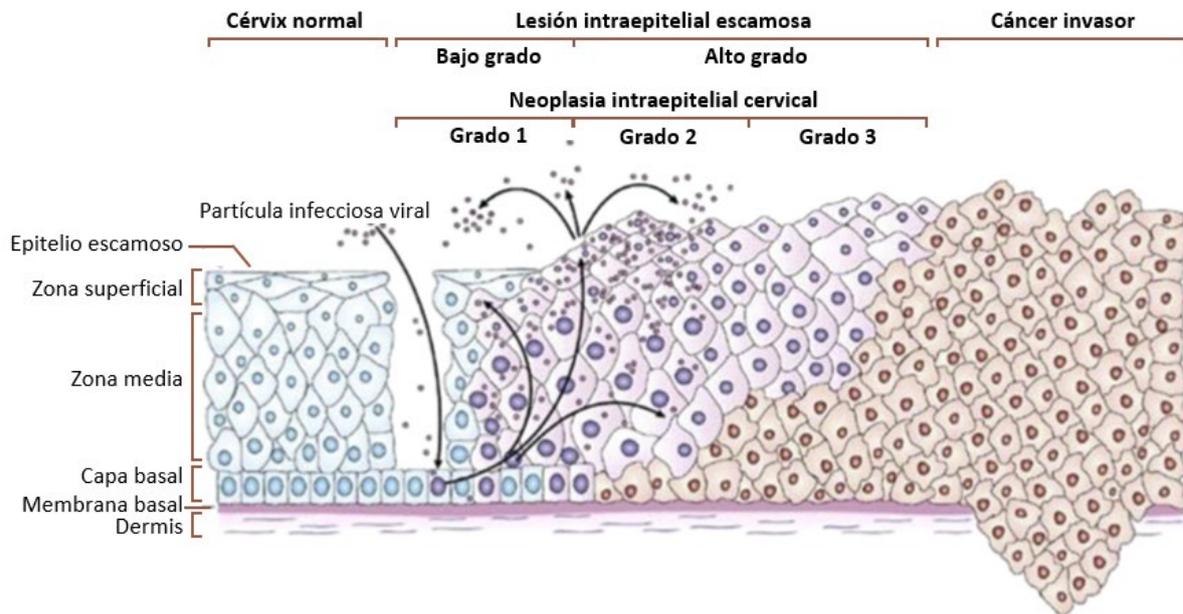


Figura 4: Representación esquemática de la infección por HPV en la mucosa cervical y las diferentes lesiones intraepiteliales escamosas. (Adaptado de de Sanjosé et al., 2018)

La infección por HPV muestra una distribución característica según la edad, que ha sido demostrada en numerosos estudios epidemiológicos (figura 5); se describe un pico en edades tempranas y cercanas a la edad de inicio de relaciones sexuales, con un descenso más o menos marcado, a medida que se avanza a edades mayores (Franceschi et al., 2006). La gran mayoría de las infecciones son transitorias, lo cual significa que son eliminadas o suprimidas por el sistema inmune mediado por células, de modo que el 90% regresan espontáneamente (clarificación) con una media entre 6-18 meses desde la primer exposición (Insinga et al., 2011; Muñoz et al., 2003; Schiffman et al., 2007; Trottier and Franco, 2006). Las infecciones producidas por tipos de HPV-AR que persisten, generan lesiones precancerosas alrededor de los 30 años de edad. Estas lesiones precancerosas pueden demorar años en evolucionar a cáncer, permitiendo su detección oportuna en el tamizaje (Schiffman et al., 2005).

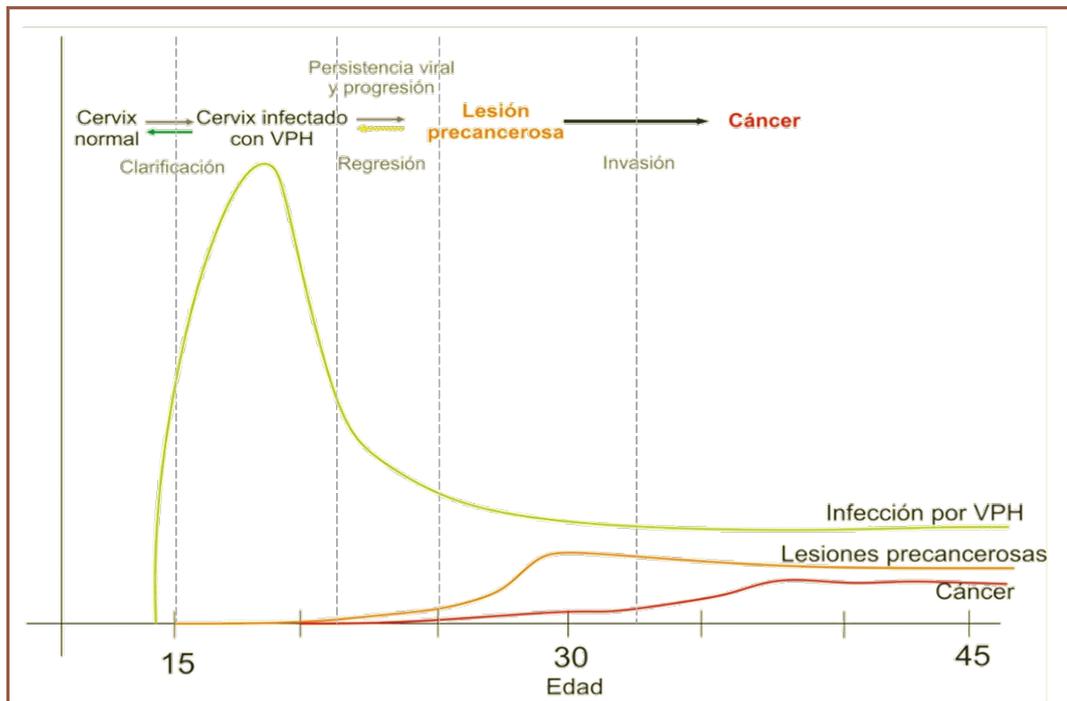


Figura 5: Prevalencia de infección de HPV, de lesiones precancerosas y de CCU, por edad de la mujer. (Adaptado de Schiffman et al., 2005).

Se sabe, además, que una vez que en la persona infectada el virus se ha hecho indetectable, se puede volver a infectar con el mismo tipo viral (reinfeción) o reactivarse la infección ya adquirida (Schiffman et al., 2007).

Los tipos de HPV-AR muestran mayor tendencia a persistir; en especial el HPV16 ha demostrado una ventaja selectiva para replicarse, mantenerse activo y transmitirse, lo que explica en gran parte su alta prevalencia a nivel mundial (Khan et al., 2005; Schiffman et al., 2010).

1.5. El HPV en la etiología del cáncer de cuello uterino

Numerosos estudios de casos y controles, y de seguimiento demostraron la asociación etiológica entre la infección persistente por HPV-AR y el CCU y sus lesiones precursoras, a partir de los años 80s, cuando se desarrollaron pruebas moleculares para la detección del ADN del HPV (Bosch et al., 2002, 1995; Walboomers et al., 1999; zur Hausen, 1996). La suma de los datos epidemiológicos y experimentales obtenidos de las numerosas

publicaciones permitió a la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, del inglés *International Agency for Research on Cancer*) elaborar en 1995 un documento estableciendo que estos virus son carcinogénicos en humanos (Bosch et al., 2002; IARC, 2007). La asociación entre la infección por los HPV-AR y el CCU cumple con los criterios de causalidad propuestos por Sir Bradford Hill, señalando a esta infección como un factor necesario para la génesis de la neoplasia (Bosch et al., 2002). De esta manera se puso fin a una controversia, dando un estímulo a la aplicación de la detección viral en el campo clínico y abriendo nuevas posibilidades en el campo de la inmunoprevención.

1.6. Potencial oncogénico viral

La carcinogénesis por HPV está basada en la capacidad que muestran ciertas proteínas de los HPV-AR de interferir en control de la proliferación celular. En las lesiones preneoplásicas severas y los cánceres, el ADN viral se encuentra integrado al genoma de la célula infectada. Este evento involucra la ruptura del gen viral E2, conduciendo a una sobreexpresión de las oncoproteínas virales E6 y E7, que interfieren con el proceso de apoptosis y control del ciclo celular, promoviendo la proliferación de las células epiteliales diferenciadas (Yeo-Teh et al., 2018). Las principales causas de esta interferencia es la inactivación de los supresores de tumores p53 y pRb (Doorbar et al., 2012; Ganguly and Parihar, 2009).

La proteína E6 está conformada por aproximadamente 150 aminoácidos, esta secuencia es muy conservada entre los papilomavirus y ejerce diversas funciones en la interacción del virus con la célula hospedera. En el extremo C-terminal contiene el motivo X-(T/S)-X-(V/I/L) que se conserva entre los HPV-AR y que se une a familia de las proteínas PDZ. La proteína E6 de HPV-AR tiene actividades oncogénicas claramente descritas, esta proteína se une a un sin número de blancos celulares, entre los que se encuentran la proteína supresora de tumores p53, proteínas con dominios PDZ y la telomerasa. La unión con la proteína p53 induce su degradación a través de la vía de la ubiquitina, lo que le permite bloquear la apoptosis, interferir con la diferenciación celular e inducir transformación celular en las células infectadas (Scheffner et al., 1993; Vande Pol and Klingelhutz, 2013).

También se ha reportado que E6 puede interrumpir la apoptosis a través de mecanismos independientes de p53, uniéndose a Bak, una proteína pro-apoptótica de la familia

Bcl-2, e induciendo su degradación por medio de la proteína E6AP vía ubiquitinación (Scheffner et al., 1993; Vande Pol and Klingelutz, 2013). En las células no infectadas la degradación de p53 por la vía ubiquitina es desencadenada por la proteína Mdm-2, y en células infectadas por HPV-AR el complejo E6/E6AP reemplaza a Mdm-2 en el control de los niveles celulares de p53 (Doorbar et al., 2015). Además, la unión de E6 a dominios PDZ de proteínas humanas induce la degradación de estas proteínas involucradas en la formación de uniones celulares, la regulación de la adhesión celular, y la proliferación de tejidos epiteliales. Esta alteración induce una desregulación en el control del crecimiento invasivo de las células epiteliales, favoreciendo la formación e invasión del tumor maligno (Pim and Banks, 2010).

Adicionalmente, E6 puede unirse y activar la transcripción de la subunidad catalítica de la enzima telomerasa, importante para el mantenimiento de las estructuras teloméricas contenidas al final de los cromosomas, lo que permite la proliferación celular e incrementa la inestabilidad cromosómica (Vande Pol and Klingelutz, 2013). Por otro lado, la proteína E6 también puede interferir con la respuesta inmunológica ante la infección viral, se ha reportado que tiene función inmunosupresora mediante su unión al transactivador de transcripción IRF-3 afectando su función de activador transcripcional, lo que desencadena una interrupción en la expresión de los genes inducidos por el interferón. Además, puede unirse a la proteína tirosina quinasa 2 (Tyk2, del inglés *Tyrosine-protein kinase*), una proteína transductora de señales de la vía Jak-STAT y por tanto interfieren en la activación de la vía de señalización del IFN- α (Vande Pol and Klingelutz, 2013). Finalmente, E6 aumenta la transcripción del gen que codifica para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*), uno de los inductores más importantes en la inducción de angiogénesis de procesos malignos, proceso esencial para el reclutamiento de nuevos vasos sanguíneos y para la expansión progresiva del cáncer (López-Ocejo et al., 2000).

La proteína E7 es considerada una oncoproteína entre los HPV-AR, desempeña un papel central en el ciclo de vida de HPV, reprogramando el entorno celular para la replicación viral, se asocia con cáncer dada sus potentes actividades transformantes (Roman and Munger, 2013). E7 está conformada por aproximadamente 100 aminoácidos, posee un sitio con motivos de dedos de zinc en su extremo carboxilo terminal, el cual se utiliza para su dimerización, en la región amino terminal contiene dos regiones homologas con la proteína E1A de Adenovirus; estos dominios son importantes para la actividad transformante, pues

permiten la interacción con diferentes proteínas celulares, incluyendo la unión y degradación de pRb. La inactivación de pRb induce la activación constitutiva del factor de transcripción E2F, el cual induce la activación de genes involucrados en la síntesis de ADN durante la fase S del ciclo celular (Roman and Munger, 2013). También, se ha reportado que la proteína E7 posee otras funciones independientes de pRb, por ejemplo su capacidad de unión a miembros de la familia de factores de transcripción AP-1, induce la activación de los promotores por un mecanismo de transactivación que lleva a la activación de genes involucrados en la progresión del ciclo celular y la mitosis (Antinore et al., 1996).

Finalmente, E7 también puede interactuar con el factor de crecimiento semejante a insulina 3 (IGFBP-3, del inglés *Insulin like Growth Factor Binding Protein 3*) modulando el proceso de apoptosis. En células senescentes la expresión de IGFBP-3 suprime la proliferación e induce apoptosis, pero en células infectadas por HPV-AR, E7 se une a IGFBP-3 provocando su proteólisis e interfiriendo con el proceso de senescencia celular (Roman and Munger, 2013).

De esta manera E6 y E7 cooperan eficientemente en la transformación de las células, lo que conduce a inmortalización celular en donde la célula no solamente es incapaz de eliminar el ADN viral, sino que también pierde la capacidad de corregir errores intrínsecos en el ADN, de modo que se van acumulando alteraciones genéticas de forma progresiva hasta convertirse en una célula con fenotipo neoplásico (Yeo-Teh et al., 2018).

En las lesiones cervicales los niveles de expresión de E6 y E7 aumentan con la severidad de la lesión. En las lesiones NIC1 se da el ciclo viral completo con la liberación de nuevos viriones (Doorbar et al., 2012) y hay poca expresión de oncoproteínas, pero cuando la infección no es aclarada se da un aumento en la expresión de E6 y E7 que conduce a la progresión a una lesión de alto grado, caracterizada por la acumulación de mutaciones que permiten la progresión a cáncer.

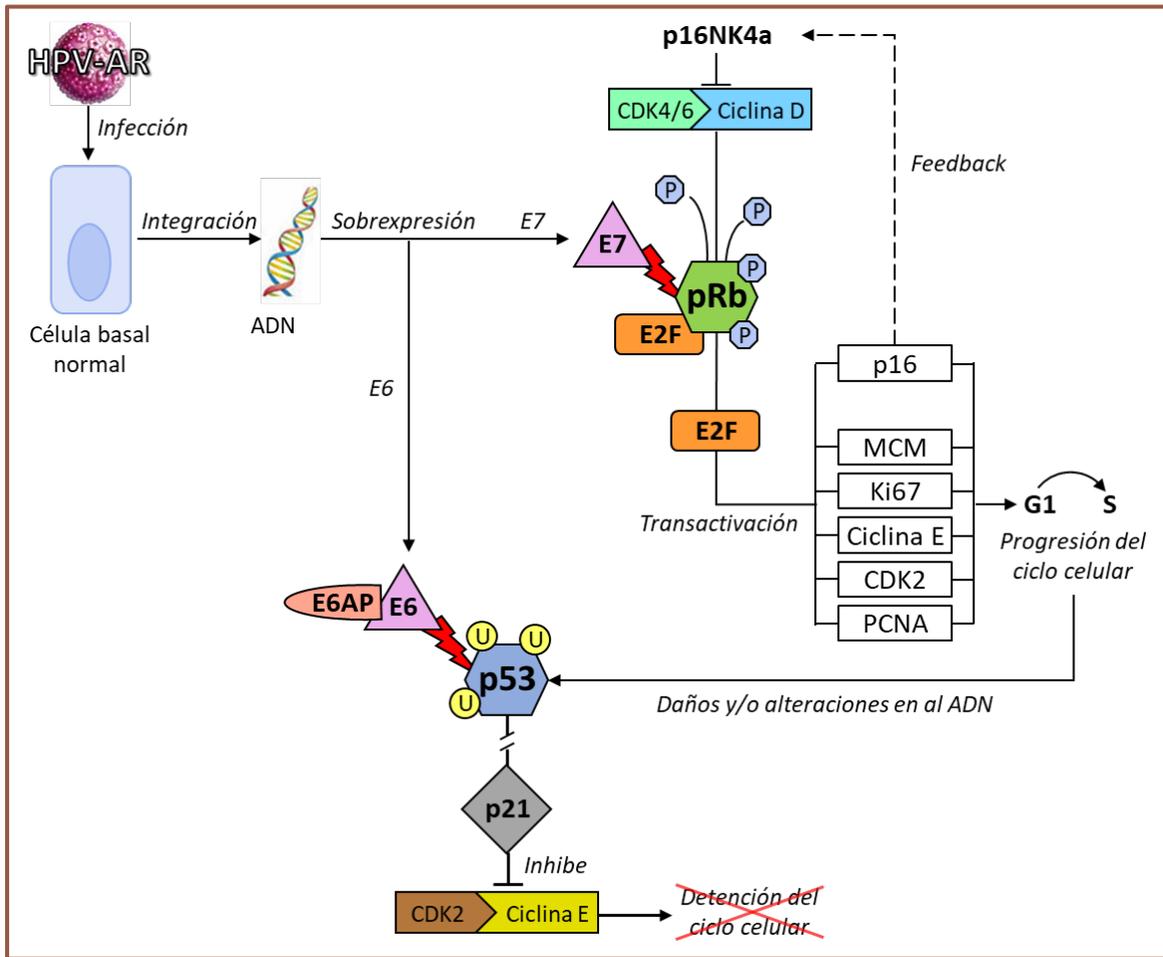


Figura 6: Proceso simplificado de desregulación del ciclo celular provocado por la infección de HPV-AR (Adaptado de Ramirez-Pineda et al., 2019)

1.7. Epidemiología de la infección por HPV

En el mundo, el CCU es el cuarto cáncer más frecuente en mujeres luego del cáncer de mama, colorrectal y pulmón. En el año 2018, GLOBOCAN reportó alrededor de 570.000 nuevos casos de CCU que representan el 6,6% del total de los cánceres en mujeres, y 311.000 muertes a causa de esta enfermedad. En los países de bajo índice de desarrollo humano (IDH), el CCU ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad después del cáncer de mama; sin embargo, en mucho de estos países que se encuentra ubicados principalmente en África y Asia, el cáncer de cuello uterino es la primera causa de muerte (Bray et al., 2018).

En América Latina y el Caribe el CCU ocupa la tercera posición en mujeres. Para el año 2018 se reportaron 56.187 casos nuevos y 28.318 muertes, y en los últimos 40 años

la cantidad de muertes debidas a CCU no ha disminuido significativamente. En Argentina, el CCU es el tercero más detectado en mujeres, con casi 4.500 nuevos casos reportados en 2018 y con la mitad de estas mujeres fallecidas a causa de esta enfermedad (Bray et al., 2018).

De acuerdo con las estadísticas del Instituto Nacional del Cáncer (INC) del Ministerio de Salud de la Nación, la mortalidad por CCU en la Argentina disminuyó a lo largo del periodo 1980-2017 a una velocidad de -0,2% anual hasta el año 2013, a partir del cual la velocidad en la reducción de la mortalidad por este cáncer aumenta anualmente a -1,2% (figura 7) (INC, 2019).



Figura 7: Tendencia de mortalidad específica por cáncer de cuello uterino: Tasas estandarizadas por edad (TAE) según población mundial por 100.000 habitantes. Argentina 1980-2017. Fuente: elaborado por el SIVER-Ca en base a los registros de mortalidad de la DEI. Ministerio de Salud de la Nación. (INC, 2019)

En el CCU, la positividad para HPV es virtualmente del 100%. Los tipos virales que ocupan el primero y segundo lugar son los HPV16 y HPV18, respectivamente, alcanzando juntos alrededor del 70% de la etiología de las neoplasias a nivel mundial (de Sanjose et al., 2010; Li et al., 2011). En América Latina y el Caribe, uno de los mayores metaanálisis realizado que incluyó más de 5.500 CCU confirmó este hallazgo, siendo los siguientes seis tipos de los HPV-AR más comunes, los HPV tipo: 31, 45, 33, 52, 58 y 35, que sumados a los HPV16 y 18

son responsables del 86,5% de esta neoplasia en la región (Ciapponi et al., 2011). En este estudio, el subgrupo de 1.000 CCU aportados por Argentina mostró una prevalencia de HPV16 del 59,5% y de HPV18 del 17,6%; sumados alcanzan un 77%, por lo que las vacunas actualmente licenciadas que incluyen a estos tipos virales en su fórmula son apropiadas para nuestra población.

La predominante circulación de HPV16 estaría fundamentada en ventajas que muestra este virus en cuanto a una mayor capacidad en su transmisión, persistencia y transformación.

El CCU es una enfermedad prevenible mediante el uso adecuado de las herramientas de tamizaje, y tratable cuando se diagnóstica oportunamente; lo ideal es prevenirlo mediante la detección temprana de las lesiones precancerosas que son completamente curables. Por esta razón, el gran número de muertes que se presenta a nivel mundial se considera evitable. Una de las principales causas por las que ocurren estas muertes es la inequidad que resulta de la falta de recursos en los países con bajos ingresos, lo que impide la implementación de estrategias efectivas de tamizaje, manejo clínico y tratamiento. La gran mayoría de los CCU diagnosticados en todo el mundo se producen en África, Asia y América Latina, debido a que son las regiones donde los programas de detección no han sido implementados masivamente o no se realizan de manera eficiente. Por el contrario, en las regiones con mayor índice de desarrollo, los programas de tamizaje basados en la citología cervical han permitido una disminución notable de los casos de CCU; estos son programas que se han hecho de manera estricta y rigurosa, y han abarcado gran parte de la población general, pero sobre todo la población con riesgo incrementado a desarrollar esta enfermedad (Vaccarella et al., 2017).

1.8. Prevención

En general, un programa de prevención está conformado por 2 niveles: prevención primaria y secundaria. A continuación, se resumen cada uno de ellos.

1.8.1. Prevención primaria: Vacunas

Se trata de vacunas recombinantes a subunidades, empleando el sistema de partículas semejantes a virus (VLPs, del inglés *Virus Like Particles*) (Cutts, 2007; Muñoz et al.,

2004; Schiller et al., 2008). Esta estrategia de ingeniería genética se basa en el clonado del gen que codifica la proteína mayoritaria de la cápside viral (L1) en un vector de expresión, que dentro de un sistema adecuado produce dicha proteína; cuando su concentración en el medio de cultivo es suficientemente alta, las moléculas de proteína se auto-ensamblan generando cápsides virales vacías, cuya morfología es casi idéntica a la del virus nativo, pero sin genoma. Las VLPs muestran la conformación “natural” de los epítopes estructurales del virus requerida para la inducción de anticuerpos neutralizantes (Stanley, 2010).

Existen tres vacunas aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, del inglés *European Medicines Agency*) que han sido evaluadas en diferentes estudios:

- Bivalente (Cervarix®, GlaxoSmithKline Biologicals, Bélgica), dirigida a HPV16 y HPV18.
- Tetravalente (Gardasil®; Merck & Co., USA / Sanofi Pasteur MSD, France), que está dirigida a dos HPV-AR (HPV16 y HPV18) y a dos HPV-BR (HPV6 y HPV11).
- Nonavalente (Gardasil® 9, Merck & Co.) que contiene los cuatro tipos incluidos en la vacuna tetravalente, más los HPV-AR tipos 31, 33, 45, 52 y 58.

Las dos primeras evitarían al menos el 70% de todos los casos de CCU, mientras que este porcentaje sube a 90% para la vacuna nonavalente (de Sanjosé et al., 2018b).

Estas vacunas fueron diseñadas para inducir una respuesta inmune humoral tipo-específica con producción de anticuerpos neutralizantes. Ambas mostraron una elevada inmunogenicidad en los ensayos clínicos, con una tasa de seroconversión del 100% y con títulos de anticuerpos 10-100 veces superiores a los generados por una infección natural.

Dada la característica profiláctica de estas vacunas (no tienen efecto sobre infecciones preexistentes), previenen la infección en individuos que no tuvieron contacto previo con el virus. Desde el punto de vista de la salud pública, el máximo beneficio se obtendría inmunizando las niñas entre 9 y 13 años, previo al inicio de la actividad sexual; sin embargo,

existen diversas estrategias y cada país decide la política a aplicarse en concordancia con la magnitud del problema en su población y sus posibilidades económicas (WHO, 2017).

En Argentina, en 2011 se incorporó al Programa Nacional de Vacunación, con carácter gratuito y obligatorio, la inmunización con la vacuna contra HPV a las niñas de once (11) años de edad, en un esquema de vacunación de 3 dosis (0-1-6 meses) con la vacuna bivalente; en el 2014, se cambió por la cuadrivalente. A mediados de 2015, se modificó el esquema de vacunación a dos dosis. A partir del 2017, se amplió la vacunación a niños de once (11) años de edad.

En noviembre de 2018, la vacuna nonavalente fue licenciada por el ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica) para su comercialización en la República Argentina.

1.8.2. Prevención secundaria: Tamizaje poblacional

La prevención secundaria del CCU está dirigida a estrategias de detección, diagnóstico y tratamiento temprano de lesiones precancerosas, con el fin de reducir la incidencia de la neoplasia o su detección en estadios iniciales. Tradicionalmente, el tamizaje para la prevención del CCU se hacía por el examen citológico de las células cérvico-vaginales, desarrollado por Georges Papanicolaou en la década del 50'. Este examen, conocido como Pap, se basa en la búsqueda de células anómalas indicativas de lesiones precancerosas o cancerosas (Papanicolaou, 1957).

En los países desarrollados, la experiencia ha mostrado que la implementación de programas organizados basados en la citología con control de calidad, ha logrado reducir significativamente la incidencia y mortalidad por CCU. Sin embargo, los países latinoamericanos que han implementado esos programas de prevención se han encontrado con limitaciones para alcanzar el impacto deseado en la carga de esta enfermedad (Almonte et al., 2010). Las principales limitaciones se asocian con la baja cobertura de mujeres tamizadas, el bajo porcentaje de mujeres con Pap anormal que son efectivamente seguidas y tratadas; la baja sensibilidad del Pap, lo que obliga a repeticiones frecuentes para reducir el porcentaje de falsos negativos; además de la carencia de controles de calidad, entre otros factores que han contribuido a la baja efectividad de la prevención basada en la citología (Cuzick et al., 2008; Denny, 2012).

Dado que la citología tiene una baja sensibilidad, se requiere su repetición frecuente; el valor promedio reportado ha sido del 50% para la detección de LIEAG. Con muy pocas excepciones, incluso en áreas donde existe un buen programa de tamización, la citología ha presentado una sensibilidad limitada (Arbyn et al., 2012; INC, 2018; Kitchener et al., 2006).

En consecuencia, desde la década de los 90, se han venido estudiando pruebas alternativas de tamizaje, principalmente la detección del ADN del HPV. Más recientemente se han evaluado estrategias de tamizaje combinando diversas pruebas con esquemas de diagnóstico y tratamiento de lesiones detectadas que se realizan en una o dos visitas al servicio de salud y aseguran una mayor adherencia y costo-efectividad de los programas de tamizaje (Almonte et al., 2010; Cuzick et al., 2012).

Las pruebas de HPV ofrecen numerosas ventajas cuando se la compara con el tamizaje citológico. Sin embargo, aún entre las mujeres mayores de 30 años, la relación entre CCU e infección transitoria es baja y los ensayos de HPV deben resolver el problema intrínseco de un valor predictivo positivo (VPP) relativamente bajo. Esta menor especificidad de las pruebas de HPV requiere de una prueba adicional (“*trriage*”) en las mujeres que son positivas para ADN de HPV-AR en el tamizaje primario, para poder identificar a aquéllas que están en riesgo de ser portadoras de una lesión precursora del CCU y, por otro lado, tranquilizar a aquéllas que sólo tendrían una infección transitoria o de bajo riesgo (Chan et al., 2012; Cuzick et al., 2012; Meijer et al., 2009; Snijders et al., 2010).

Es de suma importancia destacar que las pruebas de HPV-AR para el manejo de pacientes deben contar con su correspondiente validación clínica. De no ser así, su uso generaría una numerosa cantidad de positivos sin significado clínico, originando colposcopias, biopsias y eventualmente tratamientos innecesarios, que en su conjunto pueden dañar física y psico-emocionalmente a las pacientes. Es extremadamente necesario que las empresas pongan esfuerzo en la validación clínica de sus pruebas, siguiendo los estándares internacionales acordados; como así también, es crítico que estos resultados sean publicados en revistas internacionales con revisores que avalen su rigor científico. Los profesionales de la salud deben informarse sobre la validación clínica para el propósito requerido; los métodos aprobados por las agencias reguladoras (FDA, EMA, ANMAT) representan la opción más segura (Picconi, 2013).

En nuestro país, en 2011, el Ministerio de Salud de la Nación incorporó la prueba virológica como tamizaje primario para la prevención del CCU. El INC, a través del Programa Nacional de Prevención de Cáncer Cérvico-uterino (PNPCC), inició la implementación de esta prueba en los servicios de salud de la provincia de Jujuy; en 2013 se sumaron las provincias de Catamarca, Neuquén, Misiones y Tucumán; durante los años 2016 y 2017 los municipios de Ituzaingó, La Matanza y Florencio Varela (Provincia de Buenos Aires). En el 2018 las provincias de Chaco y Corrientes; y tres municipios más de la provincia de Buenos Aires (San Martín, Tres de Febrero y Morón). Se espera que esta estrategia se vaya incorporando gradualmente al resto del país (INC, 2018).

En el PNPCC, la población objetivo para el tamizaje con el test de HPV son las mujeres entre 30 y 64 años. Se realiza una doble toma: conjuntamente con la muestra para el test de HPV-AR se toma un extendido citológico para Pap, que sólo se leerá en caso de que el test de HPV-AR resultara positivo; la citología se realiza como prueba de triage para saber si la detección viral está asociada a una lesión en el cuello del útero que requiera tratamiento o seguimiento (INC, 2018).

Es importante destacar que el tamizaje empleando la prueba de HPV-AR se inicia a los 30 años y no antes debido a que en las mujeres muy jóvenes la gran mayoría de las infecciones por HPV son transitorias, sin relevancia clínica (figura 5). Por este motivo, en mujeres menores de 30 años con una vida sexual ya iniciada, el tamizaje debe realizarse únicamente por citología, mediante la toma del Pap.

1.9. Detección de HPV

Diversos estudios moleculares y epidemiológicos han demostrado el papel fundamental de la infección por HPV en el desarrollo del CCU; esto condujo a la creación de diversas pruebas moleculares para la detección del virus en muestras cérvico-vaginales.

Dichas pruebas moleculares se dividen en tres grupos principales según detecten: 1) ADN de HPV-AR sin discriminación de los tipos virales; es decir, que sólo reporta la presencia o ausencia de HPV-AR, 2) ADN de HPV-AR junto con la tipificación de los principales tipos de alto riesgo y 3) ARNm de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-AR (Picconi, 2013). De las pruebas disponibles, no todas cuentan con estudios que sustentan su utilidad clínica y con estudios de validación que permitan la aprobación para uso clínico (Burd, 2016).

1.9.1. Detección de ADN viral

La prueba de ADN de HPV-AR es un método molecular automatizado que detecta directamente el agente causante del CCU, por lo cual ofrece una detección precisa, objetiva y reproducible. En comparación con la citología, la prueba de HPV-AR tiene una sensibilidad superior (30-40% de ganancia). Ensayos controlados aleatorizados han demostrado que la prueba de HPV aumenta la detección de \geq LIEAG (lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado y cáncer) durante el tamizaje primario y reducen el número lesiones en rondas posteriores, lo que lleva a una reducción en el número de casos de CCU en hasta un 70%, motivo por el cual es utilizado como prueba de tamizaje (Denny et al., 2017).

En Argentina, a la actualidad, se encuentran disponibles cuatro pruebas validadas para uso clínico:

- **Captura de Híbridos 2** (CH2, del inglés *Hybrid-Capture Second Generation*, Digene Corp, Gaithersburg, MD, USA). Basada en la hibridación del ADN viral a sondas de ARN complementarias a una secuencia que es común en 13 tipos de HPV-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68). El resultado que genera es cualitativo, informando si existe infección por alguno de los 13 tipos de HPV-AR, sin la identificación del tipo que está causando la infección (PAHO, 2016).
- **Cobas® 4800** (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Considerada para realizar este trabajo. Utiliza la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR, del inglés *quantitative Polymerase Chain Reaction*), para la amplificación de un fragmento de la región L1 del HPV. Esta técnica determina específicamente y de manera individual los tipos HPV16 y HPV18, y a su vez permite la detección de forma genérica de otros 12 HPV-AR (tipos: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), utilizando la β -globina como control interno (PAHO, 2016).
- **Abbott Real Time High-Risk HPV** (Abbot Laboratories, Illinois, USA) Al igual que Cobas 4800 utiliza una qPCR que permite detectar 14 genotipos de HPV-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) y como

control interno utiliza la β -globina. Esta prueba reporta, de manera separada a los genotipos de alto riesgo 16 y 18 (PAHO, 2016).

- **Onclarity HPV Assay** (Becton Dickinson and Company, Nueva Jersey, USA.) Esta prueba es una PCR en tiempo real que amplifica la región que codifica las oncoproteínas E6/E7 de los tipos de HPV-AR. El ensayo permite detectar 14 genotipos virales, proporcionando información individual para 6 de estos tipos (HPVs: 16, 18, 31, 45, 51, y 52), también cuenta con un control de calidad interno (PAHO, 2016).

1.9.2. Detección de la oncoproteína viral E6

Las proteínas E6 y E7 de HPV-AR son cruciales en el inicio de la cascada de eventos que conducen a la transformación carcinogénica. Por este motivo, la detección de las mismas podría ser un marcador útil como método de triage para diferenciar a las mujeres que están cursando una enfermedad o podrían cursarla, de aquellas con infecciones transitorias que no poseen riesgo asociado.

Una de las pruebas existentes, que será utilizada en el presente trabajo, para la detección de la oncoproteína E6 de los tipos virales 16 y 18 (OncoE6™), fue desarrollada por la empresa Arbor Vita Corporation (Fremont, California). Consiste en un ensayo de flujo lateral o inmunocromatografía que detecta la oncoproteína E6 de los tipos virales HPV16 y HPV18. Dado que la infraestructura que se requiere para llevar adelante esta prueba es sencilla y utiliza equipamiento poco complejo, se la postula como una prueba útil para ser utilizada en regiones de bajos recursos.

Es importante destacar que se encuentran pocos estudios publicados que evalúen la capacidad de utilizar la prueba OncoE6 como método de triage. Una de las investigaciones poblacionales con mayor número de muestras utilizadas, que evaluó esta prueba, se llevó a cabo en Shanxi, China, con el objetivo de estudiar su utilidad clínica como prueba para el tamizaje primario y como estrategia para el triage de mujeres HPV positivo (Zhao et al., 2013). El estudio incluyó 7543 mujeres, entre 25 y 64 años de edad, sin antecedentes de lesión cervical. A cada participante se le realizaron múltiples pruebas; entre las que se encontraba la prueba OncoE6™ y CH2. Los autores reportaron que la prueba OncoE6™ tuvo una sensibilidad de 53,5% para la detección de \geq LIEAG, y CH2 presento una sensibilidad de 97,0% para las muestras

recolectadas. Adicionalmente, se reportó que la prueba OncoE6™ fue la prueba que presentó mayor VPP para la detección de NIC3 y cáncer, con un valor de 40,8% comparado a un VPP del 10% en las pruebas de HPV-AR (Zhao et al., 2013).

1.10. Evaluación de pruebas para triage: variables a considerar

En el marco de la prevención secundaria, el tamizaje con pruebas de HPV-AR genera la necesidad de encontrar métodos adicionales para mejorar la especificidad del test. Por esto, es fundamental realizar la evaluación de ciertos parámetros que permitan identificar que pruebas serán útiles para el triage de mujeres con resultado HPV-AR positivo.

Una prueba diagnóstica se define como cualquier procedimiento realizado para confirmar o descartar un diagnóstico clínico, su utilidad depende, de su validez y de que sea fiable fundamentalmente. El concepto de validez describe la capacidad de una prueba para estimar lo que realmente se quiere medir; para esto se realiza una comparación de los resultados de la prueba con los de un patrón de referencia (*gold standard*), que identifica el diagnóstico verdadero. Para pruebas con resultados dicotómicos (por ejemplo, presencia/ausencia de enfermedad) la evaluación se basa en varios indicadores de validez: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, los cuales permiten cuantificar la utilidad de la prueba (Gordis, 2013).

La sensibilidad y especificidad son características intrínsecas de la prueba diagnóstica que miden la capacidad de diferenciar correctamente a las personas enfermas de las sanas, mientras que los valores predictivos proporcionan estimaciones de la probabilidad de tener la enfermedad, es decir la probabilidad de que la prueba diagnóstica entregue el diagnóstico correcto.

La determinación de estos parámetros se realiza construyendo una tabla binaria o de 2x2, (tabla II) a partir de la cual se obtienen los diversos resultados probables de una prueba de diagnostica:

- **Verdadero positivo (VP):** el paciente tiene la enfermedad y la prueba diagnóstica es positiva.
- **Falso positivo (FP):** el paciente no tiene la enfermedad, pero el resultado de la prueba diagnóstica es positivo.

- **Falso negativo (FN):** el paciente tiene la enfermedad, pero el resultado de la prueba diagnóstica es negativo.
- **Verdadero negativo (VN):** el paciente no tiene la enfermedad y la prueba diagnóstica es negativa (Gordis, 2013).

		<i>Diagnostico verdadero (Gold standard)</i>	
		<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>
<i>Prueba diagnóstica en evaluación</i>	<i>Positivo</i>	VP	FP
	<i>Negativo</i>	FN	VN

Tabla II: Tabla binaria para la evaluación de una prueba diagnóstica. El diagnostico verdadero (*gold standard*) es usualmente la prueba más confiable o validada, en este caso la biopsia que nos confirma el diagnóstico, o la citología si no se dispone de biopsia.

A continuación se presentan las descripciones de cada indicador de validez, y su método de cálculo.

- **Sensibilidad:** es la capacidad de la prueba de clasificar correctamente a un individuo como enfermo; es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga un resultado de la prueba diagnóstica positivo (Cohen et al., 2016; Gordis, 2013). Teniendo en cuenta la información de la tabla II, la sensibilidad se calcula como:

$$Sensibilidad = \frac{VP}{(VP + FN)}$$

- **Especificidad:** es la capacidad de la prueba de clasificar correctamente a un individuo como sano; ósea, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo de la prueba diagnóstica (Cohen et al., 2016; Gordis, 2013). Se calcula como:

$$Especificidad = \frac{VN}{(FP + VN)}$$

- **Valor predictivo positivo (VPP):** proporción de individuos con una prueba positiva que presentan la enfermedad. El VPP se calcula como:

$$VPP = \frac{VP}{(VP + FP)}$$

- **Valor predictivo negativo (VPN):** es la proporción de sujetos con una prueba negativa que no presentan enfermedad. El VPN se calcula como:

$$VPN = \frac{VN}{(FN + VN)}$$

Se debe tener en cuenta que los valores predictivos de la prueba dependen de la prevalencia de la enfermedad en la población. Si la prevalencia aumenta, aumenta el VPP y disminuye el VPN (y a la inversa), mientras que, la sensibilidad y la especificidad por ser características intrínsecas de la prueba no se modifican por los cambios en la prevalencia (Gordis, 2013).

1.11. Proyecto ESTAMPA

El Servicio Virus Oncogénicos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) - ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” (del cual formo parte como técnica de laboratorio desde el año 2014), junto con los servicios de Ginecología y Anatomía Patológica del Hospital Nacional “Prof. Alejandro Posadas” (El Palomar, Provincia de Buenos Aires), inició en 2016 un trabajo colaborativo titulado “Estudio multicéntrico de tamizaje y triage de cáncer de cuello uterino usando pruebas del virus papiloma humano” (ESTAMPA), liderado por la IARC (Lyon, Francia), perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS). Este estudio se está llevando adelante en 12 centros ubicados en nueve países de América Latina (dos centros en Argentina, Colombia y Paraguay, y un centro en Bolivia, Costa Rica, Honduras, México, Perú y Uruguay).

El objetivo central es encontrar la mejor opción de tamizaje que detecte la mayoría de LIEAG y cáncer (\geq LIEAG) con la menor cantidad de trabajo diagnóstico, para lo cual se planeó reclutar un total de 50.000 mujeres de entre 30-64 años de edad en Latinoamérica.

Dentro del estudio serán evaluados como prueba de triage: la citología convencional (prueba de Papanicolau), colposcopia, la genotipificación del HPV-AR (Cobas 4800), la detección de la infección persistente por HPV-AR, y la detección de niveles elevados de oncoproteínas E6, entre otros (Almonte et al., 2020).

Particularmente para este trabajo de tesis, he tenido a mi cargo el relevamiento de la base de datos, la selección de las muestras con resultados positivos para HPV-AR en el

test de tamizaje primario, la genotipificación y el estudio de la expresión de la oncoproteína viral E6.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Contribuir al conocimiento de la infección por el virus papiloma humano, mediante el estudio de los genotipos y de la expresión de la oncoproteína viral E6, en lesiones de cuello uterino de distinta gravedad.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar los genotipos de HPV, tanto en infecciones simples como múltiples, en lesiones de distinta gravedad y pacientes sanas.
- Investigar la expresión de la oncoproteína viral E6 de los HPV tipos 16 y 18.
- Correlacionar los datos virológicos (genotipos de HPV y oncoproteína E6) con los datos clínicos y epidemiológicos.
- Evaluar la posibilidad de usar la expresión de la oncoproteína viral E6 como método de triage.

2.3. Hipótesis

- En citología normal y lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (\leq LIEBG) se detecta un amplio espectro de genotipos de HPV, tanto de alto como de bajo riesgo oncogénico; mientras que en las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (\geq LIEAG) se presentan casi con exclusividad los HPV de alto riesgo.
- La positividad para la proteína E6 de HPV16/18 permitiría discriminar aquéllas pacientes que realmente son portadoras de enfermedad cervical grave de las que sólo tienen infección transitoria.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Comité de ética

El Comité de Bioética “Dr. Vicente Federico Del Giudice” perteneciente al Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas, revisó y aprobó el protocolo de este estudio, aludiendo que el mismo respeta los lineamientos de la Declaración de Helsinki, las guías de la CIOMS (2016), la Resolución del Ministerio de Salud de la Nación N° 1480/11 y la Ley 25.326 de protección de datos personales (Habeas Data) (anexo 1).

Las pacientes recibieron toda la información sobre el proyecto y aquellas que accedieron a participar firmaron el consentimiento informado (anexo 2) de acuerdo a lo estipulado en el documento “Principios Éticos para las Investigaciones Médicas en Seres Humanos”, surgido de la Declaración de Helsinki (1964); esto garantizó la confidencialidad y el beneficio para las participantes (Código de Nüremberg, Declaración de Helsinki, Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos).

3.2. Diseño, población y muestras

3.2.1. Diseño del estudio

Se llevó a cabo un estudio de corte transversal. Para lo cual, se realizó un reclutamiento tanto activo como oportunista en el Servicio de Ginecología del Hospital Posadas, de pacientes asintomáticas a las cuales se les tomaron inicialmente muestras, a ciegas, para realizar una citología convencional o Pap (*Gold standard*) y una prueba de HPV-AR. En los casos en los que alguna o ambas pruebas ensayadas inicialmente fueran positiva, la mujer pasa a formar parte de lo que es llama cohorte de estudio del proyecto ESTAMPA, se las cita a una segunda visita para realizar un análisis colposcópico exhaustivo con eventual toma de biopsia o tratamiento, y seguimiento a los 18 meses (Almonte et al., 2020).

Todas las muestras de lesiones incluidas en este estudio contaron con su correspondiente diagnóstico histológico, llevado a cabo por los patólogos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Posadas. A su vez, todas las pacientes fueron debidamente

informadas de la participación del proyecto de investigación y se obtuvo en todos los casos el consentimiento informado que se adjunta (anexo 2).

3.2.2. Población

En enero 2016 comenzó el reclutamiento de mujeres asintomáticas, entre 30 y 64 años de edad, residentes del conurbano bonaerense en las inmediaciones del Hospital Posadas. Alcanzándose un total de 3.340 pacientes elegibles a fines de junio 2018. A las mujeres que aceptaron participar del proyecto se les tomó una serie de muestras cérvico-vaginales, con distintas finalidades entre las cuales se incluyó la citología convencional o Pap, y la muestra para la prueba de HPV (Cobas 4800).

Resultaron positivas para la prueba HPV-AR 510 mujeres con la siguiente distribución: 14,51% (74/510) positivas para HPV16, 4,12% (21/510) positivas para HPV18 y 67,65% (345/510) positivas para Otros HPV-AR (distintos de HPV16 o HPV18); además, hubo 70 coinfecciones, entendiéndose por coinfecciones la combinación de 2 o 3 de los resultados anteriores (figura 8). De estos números se desprende que el total de pacientes que tuvieron HPV16 y/o 18, ya sea como infección simple o múltiple, fueron 165 mujeres.

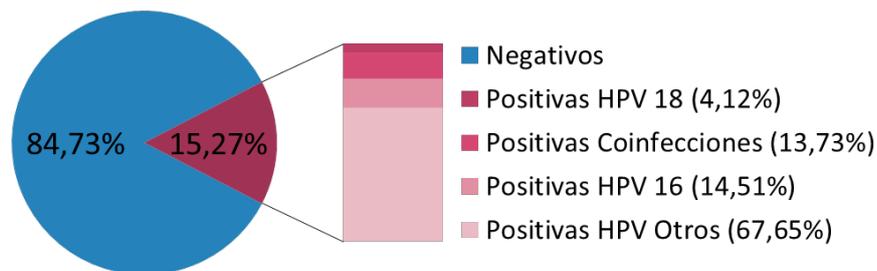


Figura 8: Positividad de la prueba de HPV-AR y su frecuencia de aparición.

El total de las mujeres participantes de ESTAMPA tuvieron a su vez, un resultado de citología convencional (Pap) que estuvo a cargo del sector de anatomía patológica del Hospital Posadas, donde trabajan cito-patólogos y cito-tecnólogos especializados. De las 510 pacientes que dieron HPV-AR positivo, solo 92 tuvieron una citología anormal; adicionalmente, hubo 47 citologías anormales con resultado de HPV-AR negativo.

En la tabla III se puede observar el diagnóstico citológico, de las 510 mujeres que fueron derivadas a la segunda visita de colposcopia con resultado HPV-AR positivo. De ellas 418 tuvieron un resultado de citología normal, 38 fueron referidas a colposcopia con una citología LIEBG (lesión intraepitelial escamosa de bajo grado), 32 por una citología LIEAG (lesión intraepitelial escamosa de alto grado), 18 por citología ASC-H (células escamosas atípicas donde no es posibles descartar LIEAG), 3 por una citología AGC (células glandulares atípicas no específicas) y 1 por una citología ASC-US (células escamosas atípicas de importancia no determinada).

<i>Diagnostico citológico</i>	<i>Frecuencia (%)</i>
Normal	418 (81,96)
LIEBG (lesión intraepitelial escamosa de bajo grado)	38 (7,45)
LIEAG (lesión intraepitelial escamosa de alto grado)	32 (6,27)
ASC-H (células escamosas atípicas donde no es posibles descartar LIEAG)	18 (3,53)
AGC (células glandulares atípicas no específicas)	3 (0,59)
ASC-US(células escamosas atípicas de importancia no determinada)	1 (0,20)

Tabla III: Frecuencia de los diagnósticos citológicos hallados en las mujeres con prueba HPV-AR positivo del proyecto ESTAMPA, durante la visita de reclutamiento.

A 217 pacientes que acudieron a la visita de colposcopia se les tomaron biopsias, ya sea porque presentaban una citología anormal o porque durante el examen colposcópico el mismo no era normal. Cada biopsia fue colocada inmediatamente en formalina buferada y fueron enviadas, procesadas y leídas por patólogos del sector de anatomía patológica del hospital Posadas. Los resultados histológicos fueron revisados por expertos patólogos convocados para este fin por la IARC-OMS. El 32,26%, 38,25%, 0,46%, 27,65% y 1,38% de las mujeres fueron diagnosticadas en la patología como negativa, NIC1, NIC2, NIC3 y CCU, respectivamente.

Para los análisis se utilizó el peor diagnóstico histológico correspondiente a la biopsia guiadas por colposcopia o a la muestra de cono cervical en los casos de mujeres que recibieron tratamiento posterior a la colposcopia por haber sido diagnosticadas con una lesión grave.

Del total de muestras recolectadas, en este trabajo de tesis se seleccionaron:

- **Para su genotipificación:** El total de las 510 muestras positivas para HPV-AR por Cobas 4800.
- **Para la detección de la oncoproteína E6 mediante el test OncoE6™ (Arbor Vita).** Se procesaron 114 muestras HPV16 y/o 18 positivas en la prueba HPV-AR con estos tipos virales. Las muestras utilizadas contaban con diagnósticos de distinta gravedad de lesión, como se puede observar en la figura 9.

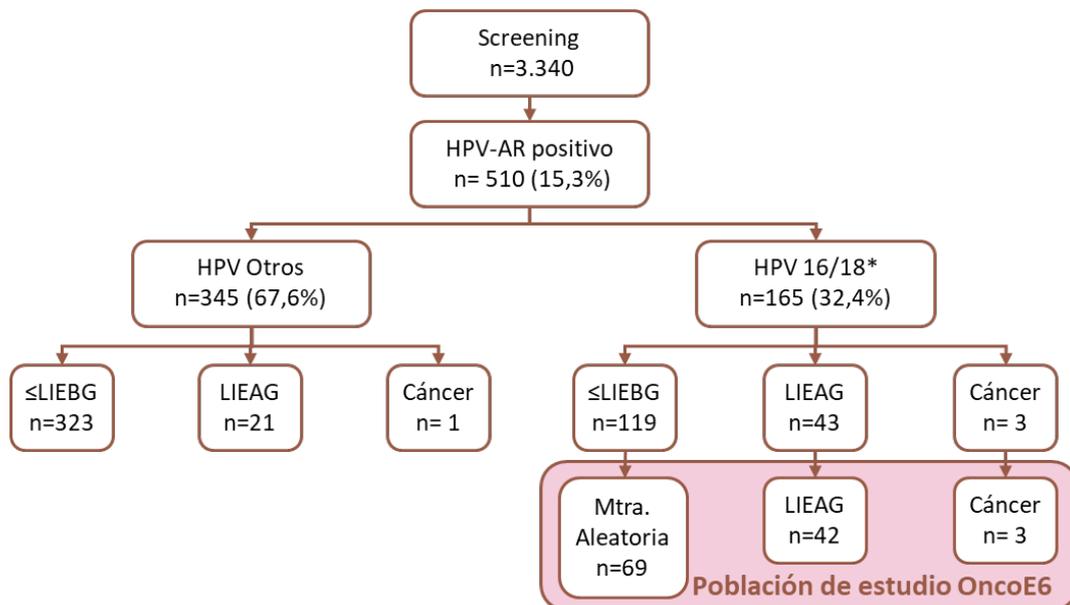


Figura 9: Esquema simplificado de la población de estudio para la prueba de OncoE6.
*Incluye las co-infecciones con Otros HPV-AR (distintos de los tipos 16 y 18) [n=67 (40,6%)]

3.2.3. Muestras

Se recolectó, entre otras, una muestra de exfoliado cervical usando el cepillo cervical Rovers® Cervex-Brush® (Broom-like collection devices, Hologic Ref: 70101-001), diseñado para la recolección simultánea de células ectocervicales, endocervicales y de la zona de transformación con un solo dispositivo (figura 10). El cepillo está formado por material hidrofóbico que facilita la liberación del material celular del cepillo tanto en un fluido como en un portaobjetos de vidrio (Rovers, 2020).

El Cervex-Brush® puede usarse para pruebas de HPV-AR y citología convencional. Por lo cual, con la toma de la muestra, se realiza en primer lugar el extendido del Pap, y luego el mismo cepillo es colocado en un medio de transporte y preservación ThinPrep® PreservCyt® (Hologic Inc., Marlborough, MA, USA), el cual contiene 20 ml de una mezcla de alcoholes que le confieren una capacidad óptima para el mantenimiento de la muestra por largos periodos de tiempo. Además, es uno de los medios de recogida indicados para la realización de la prueba HPV-AR por Cobas 4800® (Roche). Luego de llevar a cabo de la prueba de HPV-AR, con el excedente del vial PreservCyt (PC), se generan alícuotas que se almacenan a -20°C, para realizar el test de OncoE6 (Arbor Vita™), y posibles ensayos futuros que pudiesen surgir. El protocolo empleado para la de toma de muestras se detalla más adelante.

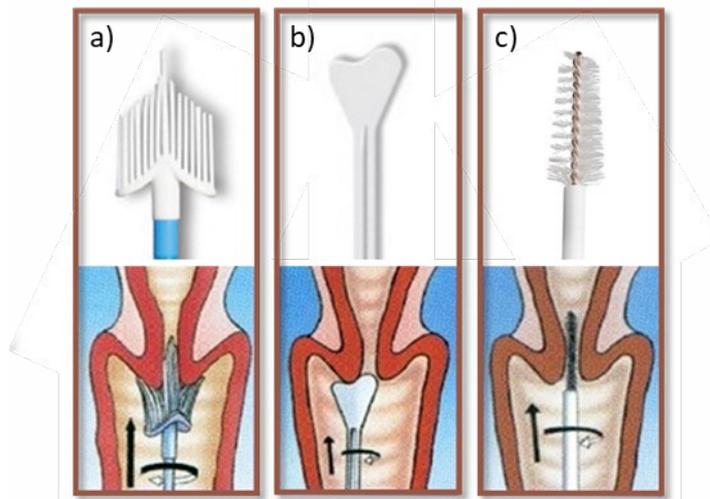


Figura 10: Diversos dispositivos utilizados para la toma de extendidos citológicos y esquema de áreas de recolección de muestra. a) Cepillo Rovers® Cervex-Brush®, b) Espátula de Ayre de punta extendida, c) Cepillo endocervical tipo Cytobrush. (Imágenes descargadas de internet)

3.3. Parte experimental

3.3.1. Toma de muestras

Como se puede observar esquemáticamente en la figura 11, para la toma de la muestra se coloca a la paciente en posición de litotomía. Se coloca un espéculo del tamaño apropiado según las características de la mujer, se identifica el cérvix claramente para observar la localización de la zona de transformación y se procede a la toma de muestra:

Se toma un cepillo cervical nuevo, se introduce en el orificio cervical y se gira 360° cinco (5) veces completas en un mismo sentido. Se retira el cepillo y se prepara una citología convencional; para ello se debe deslizar una cara del cepillo con la muestra sobre un portaobjetos nuevo pre-identificado, posteriormente se coloca el cepillo en el vial PreservCyt, se lava vigorosamente el cepillo en el medio preservante mediante agitación circular en ambos sentidos y golpeándolo contra las paredes del vial. Inmediatamente se debe a fijar la lámina de citología con la solución fijadora y dejar secar. Se retira el espéculo y se descarta en el recipiente para material biológico.

El vial PC y el extendido citológico se almacenan a temperatura ambiente hasta su posterior procesamiento.

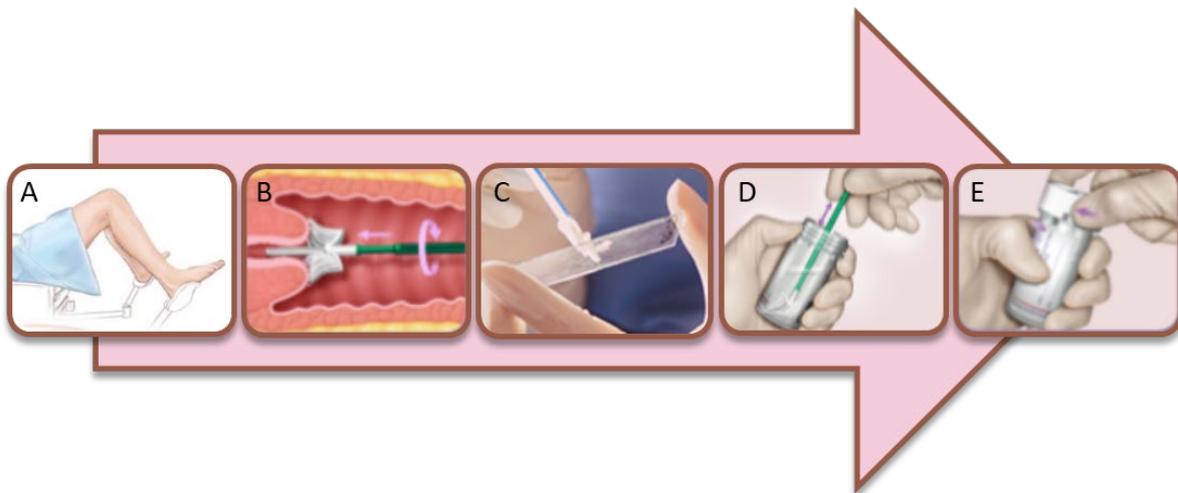


Figura 11: Esquema simplificado de toma de muestras. A) Posición de litotomía. B) Cepillo cervical introducido en el orificio cervical. C) Extendido citológico. D) Lavado del cepillo cervical en vial PC para detección de HPV por Cobas 4800. E) vial PC (Imágenes descargadas de internet)

3.3.2. Detección y genotipificación de HPV

Para este trabajo de tesis, la detección y genotipificación de HPV en muestras positivas en el tamizaje primario (n=510), se realizó previamente una extracción de ADN de las células cérvico-vaginales, para posteriormente llevar adelante una técnica de biología molecular que involucra una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) combinada con Hibridación Reversa en línea (RLB, del inglés *Reverse Line Blotting*). Es importante destacar que esta técnica no cuenta con una validación clínica, y solo es utilizada con fines epidemiológicos.

3.3.2.1. Extracción de ADN

Para la purificación de ADN se utilizó un equipo robotizado semiautomático QIAcube (QIAGEN - Hilden, Alemania), el cual utiliza insumos del kit comercial: QIAamp DNA Mini QIAcube Kit, (Catalogo 51326 - QIAGEN). El uso de este equipamiento elimina pasos del procesamiento manual lo cual favorece la obtención de resultados estandarizados y una mayor reproducibilidad.

La extracción de ADN se hizo a partir de una alícuota de 1 ml del vial PC, cada tanda de extracción conto con 23 muestras sumadas a un control de extracción (total de 24 tubos por largada).

Brevemente, se tomó 1ml de muestra, se la coloco en un tubo tipo eppendorf estéril de 1,5 ml y se la centrifugo durante 20 min a 14.000 rpm, se descartó el sobrenadante, se resuspendió en PBS pH=7,2 a modo de lavado y se centrifugo 10 min a 14.000 rpm. Este último paso se repitió una vez, obteniéndose un total de 2 lavados, y finalmente el pellet se resuspendió en 200 µl de PBS pH=7,2. A estos se les adiciono 200 µl de buffer AL (provistos en el kit), se homogeneizo y se incubo a 65°C durante 60 min en un bloque seco sin agitación.

Transcurrida la incubación se inactivo la proteinasa k a 96°C durante 10 min, se transfirió todo el volumen final (Vf) a un tubo "*Sample Tubes CB; 2 ml*" (Catalogo 990382 - QIAGEN), y se procedió a la carga de las muestras en el QIAcube junto con los demás insumos y soluciones necesarios. Se corrió el programa de purificación previamente cargado en el equipo, el mismo está programado para hacer una extracción de ADN genómico, conteniendo los pasos básicos de: 1) Fijación del ADN a una membrana de gel de sílice, mientras que los

contaminantes pasan de largo; 2) Dos lavados del ADN donde los inhibidores de la PCR, como los cationes divalentes y las proteínas, se eliminan por completo; y finalmente: 3) Elución del ADN puro ($V_f = 100 \mu\text{l}$) en tubo tipo eppendorf, en un buffer provisto con el kit.

El ADN extraído y purificado se almacena en freezer a -20°C hasta su posterior uso.

3.3.2.2. Detección de HPV

La detección de HPV se realizó mediante PCR empleando un sistema de *primers* para los genotipos del género alfa, el sistema GP5+/6+Bio (Schmitt et al., 2008; van den Brule et al., 2002). Este sistema de PCR utiliza los *primers* BSGP5+/6+Biot (anexo 3) que amplifican un fragmento de aproximadamente 140 pb dentro del gen L1 del HPV. Por ser esta región altamente conservada, permite detectar un amplio espectro de HPV, alrededor de 40 tipos distintos, que habitualmente infectan el tracto anogenital en una única reacción. Este sistema también incluye *primers* de β globina, utilizado como control interno de la reacción, produciendo un fragmento de 208 pb.

La mezcla de reacción se realizó en un V_f de $50 \mu\text{l}$ conteniendo: $0,2 \text{ mM}$ de cada dNTP; 4 pmol de cada uno de los *primers* GP5+/6+Bio; $3,5 \text{ mM}$ de MgCl_2 y $2,5 \text{ U}$ de *Taq* ADN polimerasa, (Thermo Fisher Scientific Inc. Catalogo 10342053). Se agregaron $5 \mu\text{l}$ del ADN purificado. Debido a que los *primers reverse* de la β Globina y del pool GP6+ están biotinilados, los productos de PCR pueden ser tipificados por RLB, utilizando oligosondas tipo-específicas. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer 9700 (Applied Biosystems). El programa de ciclado fue el siguiente: 94°C 4 min, seguidos de 40 ciclos, 94°C 20 seg, seguido de una rampa, de $5,39^\circ\text{C}/\text{seg}$ hasta 38°C , 38°C por 30 seg, seguido de una rampa, $4,43^\circ\text{C}/\text{seg}$ hasta 71°C , 71°C durante 80 seg y 71°C 4 min. Como control positivo (CP) se usó ADN de las líneas celulares SiHa y HeLa (provenientes de CCU portadoras de HPV16 y HPV18 respectivamente) y como control negativo (CN) se utilizó ADN de una línea celular de retinoblastoma, C33A (HPV negativa) y agua destilada.

3.3.2.3. Genotipificación de HPV por PCR-hibridación reversa

Para realizar la genotipificación viral, luego de la amplificación anteriormente descrita, se llevó a cabo una hibridación reversa en línea. Esta estrategia usa oligosondas tipo-específicas (anexo 4) permitiendo la identificación de 36 tipos virales y el control interno de β Globina, en un mismo ensayo.

El procedimiento se llevó a cabo usando un dispositivo, *miniblotter* (Hoefer) (figura 12) e incluyó tres etapas: 1) preparación de la membrana; 2) reacción de hibridación; 3) detección de los híbridos formados.

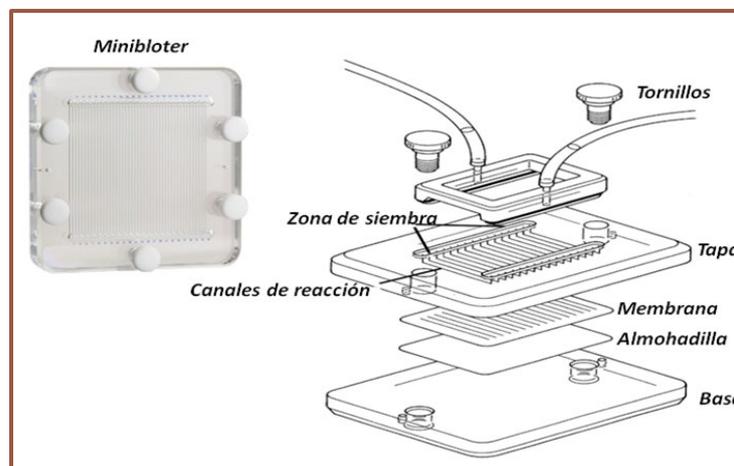


Figura 12: Representación esquemática de un *miniblotter* y su armado.

1) Preparación de la membrana:

El procedimiento se realizó siguiendo el procedimiento de operación estándar (POE) del Servicio Virus Oncogénicos del INEI - ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

En primer lugar, las oligosondas fueron sintetizadas incluyendo un grupo amino terminal en la posición 5', con el fin de poder ser fijadas covalentemente a una membrana de nylon, Biotodyne C (Pall Corporation, cat n° 60314).

Brevemente la preparación de la membrana, comprende los siguientes pasos:

- Activación de la membrana mediante el tratamiento con una solución de EDAC 16% (Calbiochem, cat n°341006), a temperatura ambiente, durante 10 min.

- Sembrado de 140 μ l de cada una de las 37 oligosondas (20mM) en los canales paralelos del *miniblotter* y del control de quimioluminiscencia (2 μ M).

- Remoción del líquido residual mediante aspiración con bomba de vacío.
- Incubación de la membrana con 100 ml de NaOH 100 mM, a fin hidrolizar los restos carboxilos disponibles remanentes de la membrana.
- Lavado con una solución 2xSSPE - 0,1% SDS a 60°C durante 5 min y finalmente, lavado con 100 ml de EDTA 20 mM (pH=8) durante 15 min.
- Almacenamiento de la membrana a 4°C, en bolsa plástica con cierre hermético, embebida con una solución de EDTA 20 mM (pH=8), para evitar la sequedad.

2) Reacción de hibridación:

Los productos amplificados por PCR BSGP5+/6+ biotinilados fueron sembrados en los canales del *miniblotter*, colocando la membrana de manera tal que las muestras queden en forma perpendicular a las líneas donde fueron previamente fijadas las oligosondas (realizando un giro de 90° de la membrana).

Brevemente, el procedimiento se llevó a cabo mediante las siguientes acciones:

- Añadir 10 µl de los productos amplificados biotinilados a 150 µl de 2X SSPE - 0,1% SDS y desnaturalizar durante 10 min a 95°C.
- Disponer la membrana de nylon sobre una almohadilla (GE Healthcare Bio-Sciences cat n° 11-0035-21) en el *miniblotter*, de manera que las hendiduras del mismo queden perpendiculares a las líneas donde anteriormente fueron fijadas las oligosondas.
- Remover el líquido residual mediante aspiración.
- Cargar los canales del *miniblotter* con 140 µl del producto de PCR previamente diluido.
- Incubar a 42°C durante 60 min en un horno de hibridación.
- Remover las muestras del *miniblotter* mediante aspiración por vacío, y lavar la membrana 2 veces con 100 ml de una solución 2x SSPE - 0.5 % SDS, a 52°C durante 10 min.

3) Detección de los híbridos formados

Esta etapa incluye tres pasos: la unión de los híbridos biotinilados con la enzima streptavidina marcada con peroxidasa, la reacción de quimioluminiscencia y el revelado fotográfico de la película.

En resumen, se realizaron las siguientes acciones:

-
- Incubación de la membrana con una dilución 1:4000 del conjugado estreptavidina-peroxidasa (GE Healthcare, cat n° RPN 1231), en 20 ml de 2X SSPE - 0,5% SDS a 42°C durante 45 min en horno de hibridación STRATAGENE en una botella en rotación.
 - Lavado de la membrana 2 veces con 150 ml de 2X SSPE - 0,5% SDS a 42°C durante 10 min.
 - Lavado de la membrana 2 veces con 150 ml de 2X SSPE a temperatura ambiente 5 min.
 - Incubación de la membrana con el reactivo de detección ECL™ (GE-Healthcare, cat n° RPN3004) durante 2 min a temperatura ambiente.
 - Exposición de la membrana (entre dos hojas de acetato transparente), a la placa radiográfica (GE Healthcare cat n° 28906836), durante toda la noche, dentro de un casete de radioautografía.
 - Revelado de la placa radiográfica en un cuarto oscuro empleando el revelador (AGFA G150) y posteriormente el fijador (AGFA G334).
 - Lectura e interpretación de resultados (el protocolo se detalla en la sección de resultados).

El proceso completo se resume en la figura 13. Debido a que estas membranas son reutilizables, una vez terminada la reacción de detección, se procedió a la regeneración de la membrana, que incluye la deshibridación del híbrido previamente generado. Este tipo de membrana puede ser usada como mínimo 10 veces. Este tratamiento se llevó a cabo mediante 2 lavados de 30 minutos con una solución de SDS 1% a 80°C y 1 lavado de 15 min con EDTA 20mM (pH=8). Las membranas se guardaron a 4°C, embebidas en una solución EDTA 20mM (pH=8).

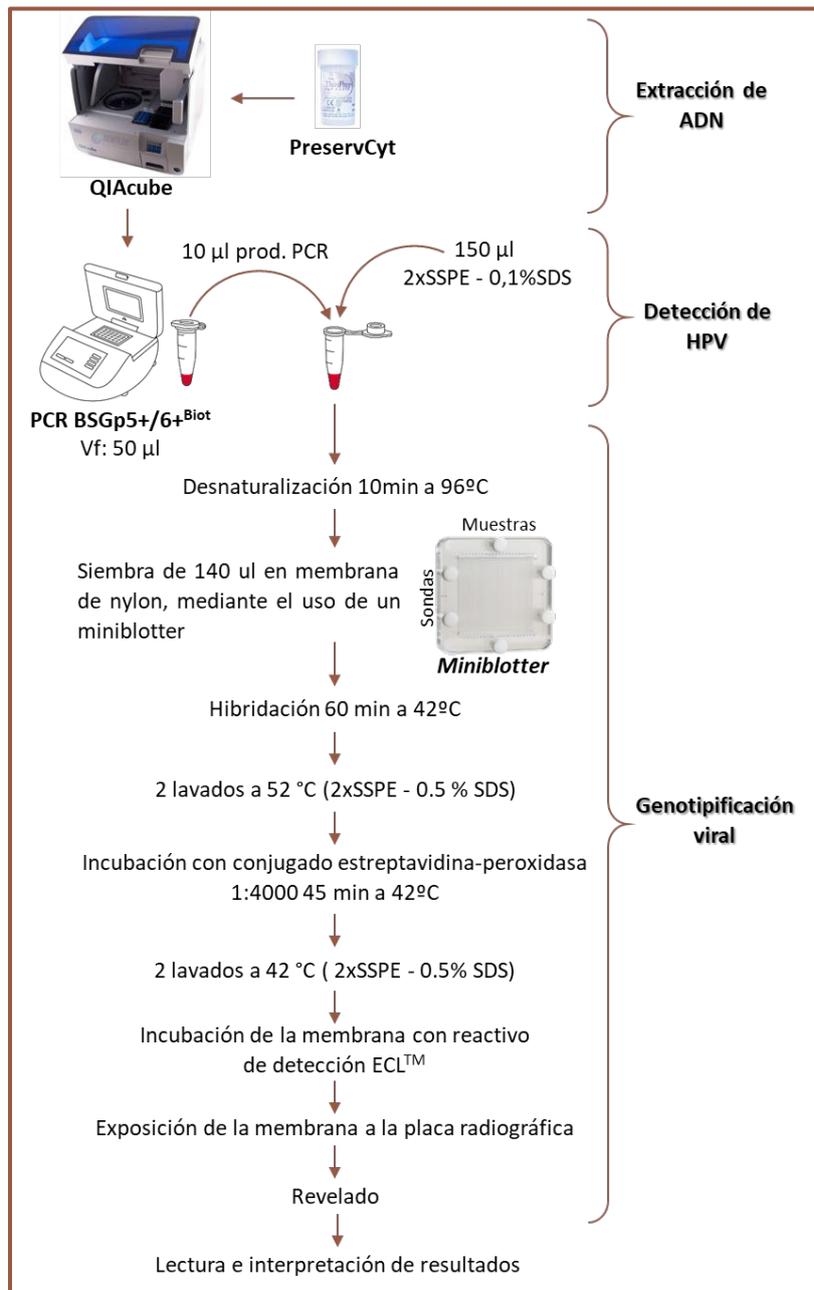


Figura 13: Esquema de las etapas de detección y genotipificación de HPV por PCR-Hibridación Reversa.

3.3.3. Detección de la oncoproteína E6 de HPV16/18

La prueba OncoE6™ Cervical Test, utilizada en el presente trabajo de tesis, se llevó a cabo sobre 114 muestras previamente genotipificadas para HPV-AR 16/18. Dicha prueba, consiste en un ensayo de flujo lateral o inmunocromatografía; es una prueba cualitativa

que detecta niveles elevados de oncoproteína E6 expresada por el virus del papiloma humano de tipo 16 y/o 18.

El fundamento de esta técnica consiste en realizar la lisis de las células cervicales mediante el uso de un tampón de extracción, permitiendo la liberación del material intracelular. Consecutivamente, el lisado es incubado con anticuerpos monoclonales (mAb) conjugados con fosfatasa alcalina (PA) que van dirigidos contra la proteína E6 de HPV16 y HPV18. Posteriormente, la tira reactiva de la prueba es sumergida en la mezcla de lisado de muestra/mAb-PA, dándose la migración de la mezcla sobre la tira reactiva por el fenómeno de capilaridad. En caso de que la oncoproteína E6 esté presente es capturada e inmovilizada por un segundo anticuerpo, previamente unido en la superficie de la tira reactiva; la formación del sándwich mAb-E6-mAb se visualiza mediante la adición de una solución de revelado (sustrato enzimático) que permite la aparición de una línea púrpura en las ubicaciones respectivas para E6 de HPV16 o 18.

En el anexo 5 se provee la guía rápida del OncoE6 Cervical Test adaptada al español; a continuación se detallan brevemente las indicaciones del fabricante para llevar adelante el procedimiento.

- Se tomó una alícuota de 2ml de la muestra, almacenada a -20°C y se dejó atemperar a temperatura ambiente durante 30 min, se homogeneizó con vortex y se transfirieron a un tubo de lisis provisto por el kit.

- Se centrifugo a 14.000 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante.

NOTA: El pellet debe ser visible y $\geq 1,5$ mm en su diámetro más ancho, de lo contrario, la muestra se considera inválida por cantidad no suficiente.

- Se resuspendió el pellet en 930 μl de solución de enjuague, para realizar un lavado y se centrifugo a 14.000 rpm durante otros 5 min.

- El pellet se resuspendió en 372 μl de solución de lisis A y se agito en rotador de 360° durante 15 min a 8 rpm. Posteriormente, se adicionaron 35 μl de solución de acondicionamiento B y se continuó agitando en iguales condiciones otros 15 min.

- Se centrifugo por 10 min, a velocidad máxima (14.000 rpm) y se transfirieron 200 μl de sobrenadante a otro tubo que contiene un amplificador de detección liofilizado. Se agitan los tubos con movimientos circulares sobre una superficie plana para disolución, y empleando la gradilla provista por el fabricante se coloca la tira reactiva previamente rotulada,

de forma que quede inclinada hacia atrás, como se aprecia en la figura 14. Se incubo (corrió) durante 55 min a temperatura ambiente.

- Luego se transfirió la tira reactiva a un vial color ámbar donde previamente se cargaron 200 µl de solución de lavado D, y se deja reposar durante 12 min.

- Se trasladó la tira reactiva a otro tubo con 650 µl de solución de desarrollo E, y según la temperatura del ambiente medida es el tiempo de incubación en esta solución, (en todos los procedimientos realizados se trabajó a 24°C de temperatura ambiental por lo cual la incubación siempre fue de 15 min).

- Inmediatamente se coloca la tira reactiva en la guía de lectura (figura 14), se leen y registran los resultados dentro de los 3 min posteriores a la finalización del protocolo. Según las especificaciones del fabricante el resultado es positivo si la prueba es válida y se puede visualizar una línea púrpura de cualquier intensidad.

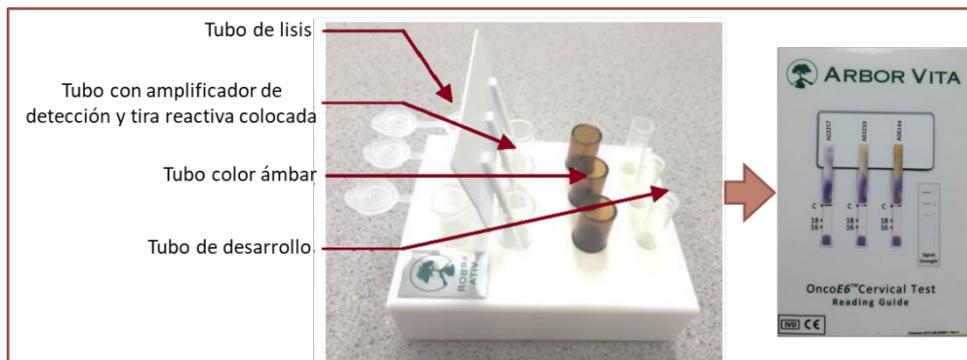


Figura 14: Elementos empleados para el test OncoE6. A la izquierda: gradilla provista por el fabricante con los distintos tubos empleados y tira reactiva. A la derecha: tira reactiva sobre la guía de lectura.

3.3.4. Análisis estadístico

Para los cálculos estadísticos se usó el programa RStudio, versión 1.2.133, ©2009-2019 RStudio, Inc. Los intervalos de confianza se calcularon con una distribución binomial considerándose valores estadísticamente significativos valores de p menores de 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Genotipificación de HPV por PCR-hibridación reversa

Uno de los objetivos específicos de este trabajo fue la identificación de los genotipos de HPV, tanto en infecciones simples como múltiples, que se realizó mediante PCR seguida de hibridación reversa en línea.

La interpretación de los resultados se lleva a cabo mediante una grilla confeccionada para tal fin, siguiendo los siguientes pasos:

- Centrar la placa radiográfica revelada, sobre la grilla de lectura, utilizando los controles positivos (HPV16 y 18) y de quimioluminiscencia (se observa como una línea negra continua horizontal).

- Comenzar la interpretación de los resultados, cruzando el tipo viral ubicado a la derecha e izquierda de la grilla, con el canal de la muestra, ubicado en la parte superior e inferior de la grilla.

La presencia en la película radioautográfica de una mancha oscura a la altura de uno (infección simple) o varios tipos virales (infección múltiple), indica su presencia en la muestra ubicada en ese canal. La figura 15 muestra una imagen de la película de la membrana hibridada montada sobre una grilla de lectura.

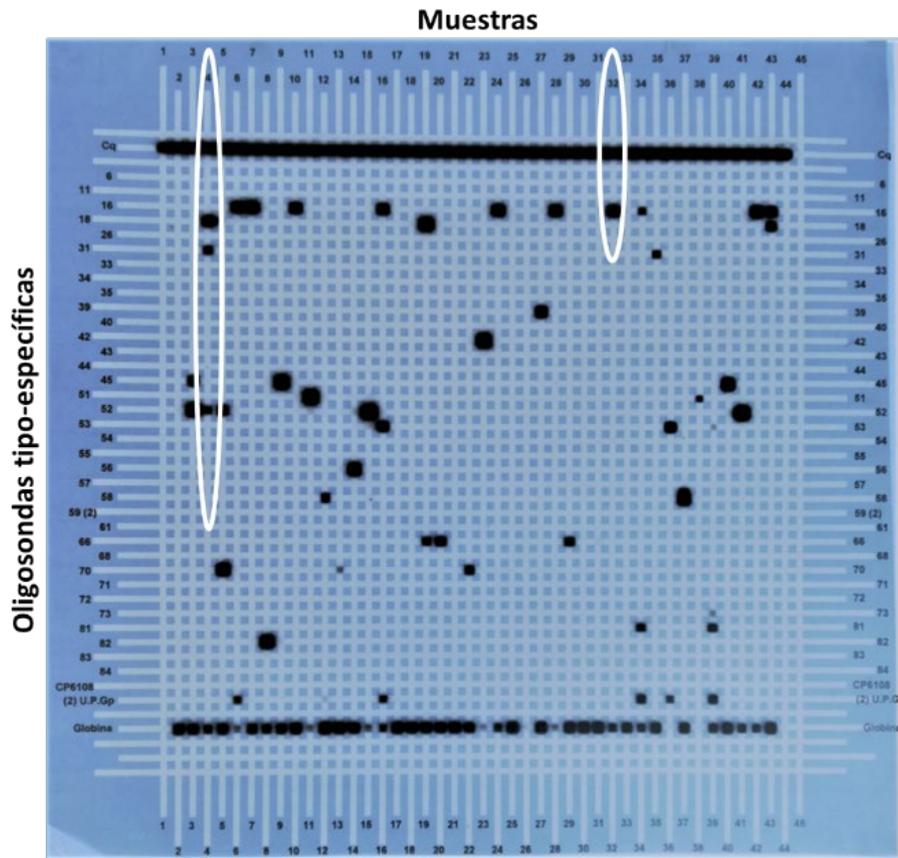


Figura 15: Foto de una película revelada en las que aparecen las marcas correspondientes a los positivos. Ej: calle 4 (infección múltiple): HPV tipos 18, 31, 52; Calle 32 (infección simple): HPV16. En la primera línea, control de quimioluminiscencia (Cq) y en la última el control de integridad del ADN (Globina).

De esta manera, se obtuvo el resultado de la genotipificación de las 510 pacientes HPV-AR positivo por Cobas 4800. El 100% de las muestras resultaron aptas para realizar el ensayo, lo cual se evidencia por la presencia de β -globina o alguno de los tipos de HPV.

En las 510 muestras se detectaron un total de 35 genotipos virales, la frecuencia de aparición se muestra en la figura 16. El HPV16 fue el genotipo más frecuente, se detectó en el 25,7% de las muestras (131/510) seguido por los HPV tipos 52 y 56, ambos con 12,5% (64/510). En el 7,6% (39/510) de las muestras no pudo detectarse ningún genotipo viral, registrándose como No Detectable (ND); el 45,3% (231/510) fueron Infecciones Simples (IS); y en el 47,1% (240/510) restante se observaron Infecciones Múltiples (IM) con un máximo de 8 tipos de HPV coinfectando.

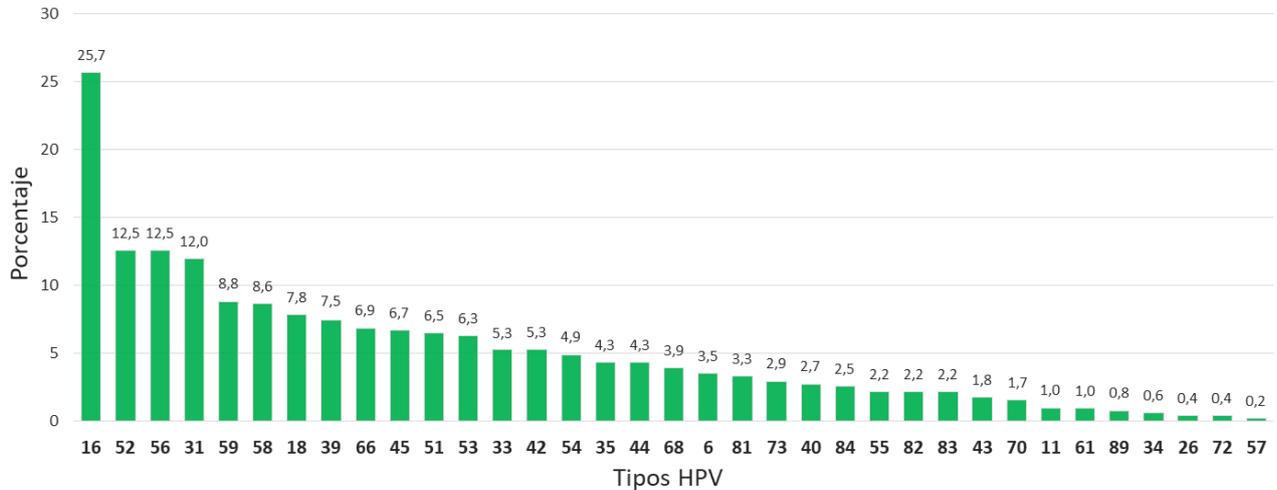


Figura 16: Frecuencia de tipos de HPV en muestras HPV-AR positivas por Cobas 4800. (n=510)

Al agrupar las muestras según los diagnósticos cito-histológicos en \leq LIEBG, donde se incluyen pacientes con lesiones de bajo grado y normales, y \geq LIEAG que contempla lesiones de alto grado y cáncer (figuras 17 y 18). Se observa la diferencia en cuanto a la cantidad y frecuencia de tipos de HPV hallados en un grupo y el otro; como también, la prevalencia casi exclusiva de los HPV-AR en el grupo \geq LIEAG.

En pacientes con diagnósticos de \leq LIEBG (n=442) se detectaron 35 tipos de HPV, siendo el de mayor frecuencia observada el HPV16 con 19,9% (88/442), seguido de los HPV tipos 52 y 56 con el 13,8% (61/442) y 13,6% (60/442) respectivamente. A su vez, el 49,8% (220/442) fueron IM; en el 41,8% (185/442) se hallaron IS y el 8,4% (37/442) de los casos fueron ND (figura 17).

Al agruparse en pacientes con diagnóstico \geq LIEAG (n=68) la cantidad de los tipos de HPV identificados se redujo a 21, y la prevalencia de HPV16 ascendió al 63,2% (43/68), seguido del HPV31 con 16,2% (11/68) y HPV58 con el 10,3% (7/68). No se detectaron genotipos virales por esta técnica en solamente 2 muestras (2,9%), las IM se representaron por el 29,4% (20/68) de los casos y el 67,7% (46/68) fueron IS (figura 18).

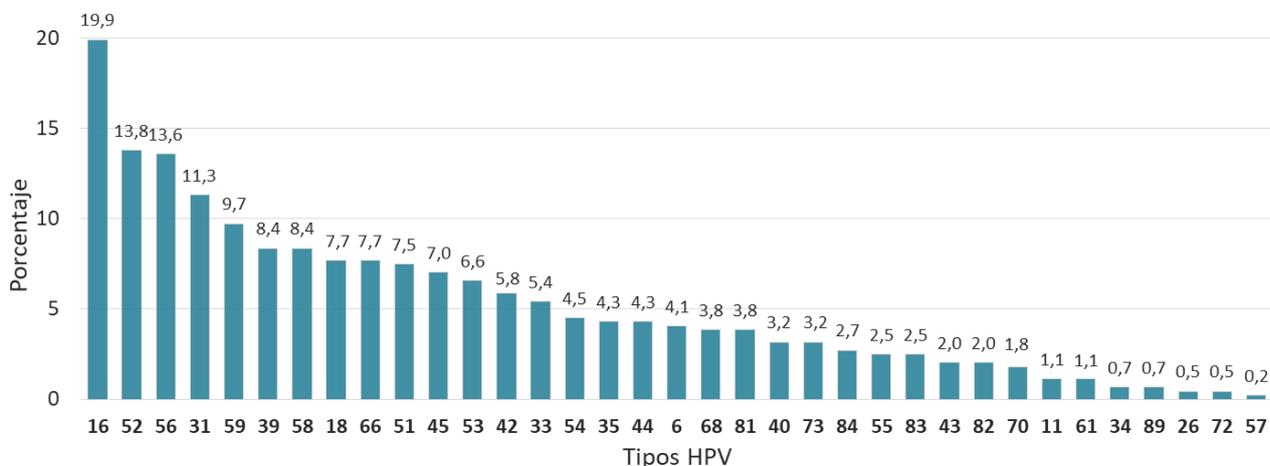


Figura 17: Frecuencia de tipos de HPV en muestras con diagnostico $\leq\text{LIEBG}$, (n=442)

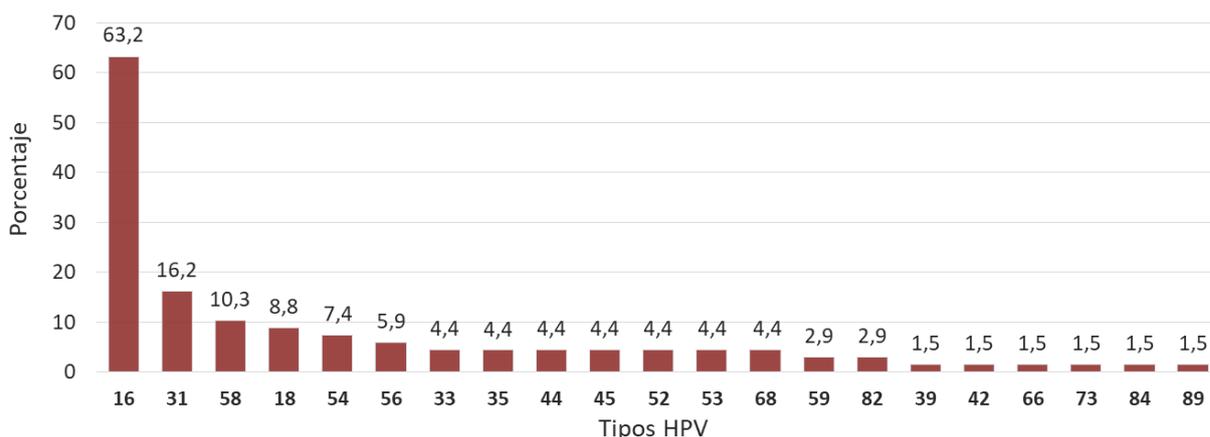


Figura 18: Frecuencia de tipos de HPV en muestras con diagnostico $\geq\text{LIEAG}$, (n=68)

4.2. Detección de la oncoproteína E6 de HPV16/18 y análisis de validez en la prueba de triage

A fin de investigar la expresión de la oncoproteína viral E6 de los HPV16 y HPV18, se realizó la prueba OncoE6TM, cuyos resultados se interpreta siguiendo la tabla IV.

Resultado Negativo	Resultado positivo para E6 de HPV16	Resultado positivo para E6 de HPV18	Resultado Invalido
<p>Solo la línea de control positivo interno (C) es visible.</p> 	<p>Las líneas de control positivo interno (C) y la línea 16 son visibles.</p> 	<p>Las líneas de control positivo interno (C) y la línea 18 son visibles.</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - No hay una línea de control positivo interno (C). - Las líneas de control o prueba aparecen como líneas discontinuas o no cubren todo el ancho de la tira. - Hay un fondo púrpura oscuro fuerte en general. - Hay rayas o puntos que oscurecen las líneas.

Tabla IV: Interpretación del resultado de la prueba OncoE6™

En la evaluación de la expresión de la oncoproteína viral E6 como método de triage, la prueba OncoE6 fue positiva en 68/114 (57,02%) de las mujeres, arrojando 11 casos positivos para la proteína E6 de HPV18 y 54 casos positivos para la proteína E6 de HPV16.

En la tabla V se muestran los resultados de positividad y negatividad obtenidos para la prueba, relacionados con el diagnóstico clínico de las pacientes en todos los casos donde se detectó HPV16 y/o 18 (incluye 42 casos de co-infecciones con otros tipos virales de alto riesgo oncogénico). En la misma tabla, a su vez, figuran los distintos cálculos estadísticos, los cuales son indicadores de validez de la prueba, con sus respectivos intervalos de confianza con un 95% de certeza (95% IC). Se reportan también los resultados obtenidos cuando se realiza una división en dos grupos según la edad, 30-44 (n=67) y 45-65 (n=47) años.

Por otro lado, en la tabla VI se realizó el mismo análisis recientemente descrito, pero limitándose a las pacientes que poseían infecciones simples para los HPV16 y/o 18 (n=72).

Todos los casos HPV16/18*

	≤LIEBG	LIEAG	Cáncer	Sensibilidad ≥LIEAG (95%IC)	Especificidad (95%IC)	VPP (95%IC)	VPN (95%IC)
Todas las mujeres (n=114)							
E6 positivo	23/69	39/42	3/3	93,3	66,7	64,6	93,9
E6 negativo	46/69	3/42	0/3	(82,1- 97,7)	(54,9-76,6)	(52,5-75,1)	(83,5-97,9)
30-44 años (n=67)							
E6 positivo	15/34	30/32	1/1	93,9	55,9	67,4	90,5
E6 negativo	19/34	2/32	0/1	(80,4-98,3)	(39,5-71,1)	(53,0-79,1)	(71,1-97,3)
45-64 años (n=47)							
E6 positivo	8/35	9/10	2/2	91,7	77,1	57,9	96,4
E6 negativo	27/35	1/10	0/2	(64,6-99,6)	(61,0-87,9)	(36,3-76,9)	(82,3-99,8)

Tabla V: Resultados generales de los indicadores de validez de la prueba OncoE6: Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN). (*Se incluyen 42 casos con co-infecciones con otros HPV-AR distintos de 16 y 18.)

Restringida a infecciones simples HPV16/18

	≤LIEBG	LIEAG	Cáncer	Sensibilidad ≥LIEAG (95%IC)	Especificidad (95%IC)	VPP (95%IC)	VPN (95%IC)
Todas las mujeres (n=72)							
E6 positivo	14/39	29/30	3/3	97,0	64,1	69,6	96,2
E6 negativo	25/39	1/30	0/3	(84,7- 99,8)	(48,4-77,3)	(55,2-80,9)	(81,1-99,8)
30-44 años (n=45)							
E6 positivo	7/21	22/23	1/1	95,8	66,7	76,7	93,3
E6 negativo	14/21	1/23	0/1	(79,8-99,8)	(45,4-82,8)	(59,1-88,2)	(70,2-99,7)
45-64 años (n=27)							
E6 positivo	7/18	7/7	2/2	100	61,1	56,3	100
E6 negativo	11/18	0/7	0/2	(70,1-100)	(38,6-79,7)	(33,2-76,9)	(74,1-100)

Tabla VI: Resultados de los indicadores de validez de la prueba OncoE6 acotados a infecciones simples de HPV16 y/o 18: Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN).

5. DISCUSIÓN

El CCU es una enfermedad que se puede prevenir mediante dos estrategias muy efectivas, la vacunación contra el HPV y el tamizaje que permite diagnosticar y tratar en un estadio temprano. En 2018, la Organización Mundial de la Salud anuncio las acciones, y el 17 de noviembre de 2020 concretó el lanzamiento de la estrategia global para acelerar la eliminación del CCU (WHO, 2020, 2019).

Este involucra un plan estratégico que abarque las metas para extender la vacunación contra el HPV, la detección y el tratamiento del CCU y el precáncer, particularmente en los países con niveles de ingresos bajo y medio. Previamente, este organismo había recomendado que los países establezcan la prevalencia de los diferentes tipos de HPV, la incidencia de anomalías cervicales y lesiones precancerosas.

En este contexto, es que se buscó estudiar los genotipos circulantes en esta población y correlacionarla con lesiones de diversa gravedad y pacientes sanas. Estudiar la prevalencia y describir el perfil genotípico en distintas regiones es importante en las estrategias de prevención del CCU, proporcionando la base para optimizar los programas de prevención adecuados.

Un punto importante a considerar una vez iniciada la vacunación contra HPV en Argentina en 2011 es realizar la vigilancia virológica, que puede llevarse a cabo a corto (adolescentes sexualmente activas), mediano (mujeres con lesiones genitales) o largo plazo (cáncer cérvico uterino). Este estudio permitió construir una línea basal de prevalencia tipo-específica en mujeres no vacunadas contra la cual comparar futuras mediciones en grupos similares de mujeres, pero que hayan sido vacunadas. La medición del impacto de la vacunación sobre la prevalencia de HPV en las mujeres sexualmente activas en edad de tamizaje es un objetivo razonable y practicable para el monitoreo de la inmunización contra HPV y podría ayudar a predecir mejor el efecto de la inmunización sobre las lesiones precancerosas y el CCU.

La distribución y prevalencia de los genotipos del HPV varían con el grado de enfermedad cervical, la edad y la ubicación geográfica de las pacientes (Herrero et al., 2005; Otero-Motta et al., 2011). En un metaanálisis de 1 millón de mujeres con análisis citológicos, el HPV16 resulto el más frecuente y el HPV18 se encontró en muchas regiones como el segundo más frecuente. No obstante, el HPV31 ocupa el segundo lugar en frecuencia en Europa y el

HPV52 en África, lo que apunta a la importancia de otros HPV-AR distintos del 16/18 en determinadas regiones (Bruni et al., 2010). En esta investigación el HPV16 fue el tipo más frecuente encontrado (25,7%), al igual que lo que se observó en casi todos los estudios de tamizaje poblacional, independientemente del diseño del estudio (Bosch et al., 2008; Delgado et al., 2012).

La prevalencia de HPV16 y 18 aumenta conforme aumenta la gravedad de la lesión y están asociados a aproximadamente el 70% de los casos de CCU en todo el mundo, pero también son los tipos más frecuentes observados en mujeres con citología normal (de Sanjose et al., 2010; Kjaer et al., 2008; Li et al., 2011). En este trabajo, el HPV16 en \leq LIEBG fue el más frecuente con 19,9%, y la suma de HPV16 (63,2%) y HPV18 (8,8%) se detectó en el 72% de las mujeres con \geq LIEAG, esto coincide con lo descripto a nivel mundial (de Sanjose et al., 2010; Li et al., 2011).

A lo largo de los años se han publicado varios trabajos que analizan por distintos métodos, diversas poblaciones distribuidas en la República Argentina que por lo general coinciden en que el HPV16 es el más prevalente. Uno de ellos, en población Guaraní de la provincia de Misiones, reportó una prevalencia del 30,8% para el HPV16 (Tonon et al., 2003). Otro realizado en 227 mujeres sexualmente activas de la etnia aborigen Pilagá (Formosa, Argentina) fueron identificados 21 genotipos, de los cuales los más frecuentes fueron HPV16 (19,4%), HPV6 y HPV18 (5,3%), HPV58 (3,5%) y HPV31 y 33 (3,1%) (Deluca et al., 2012). En la ciudad de La Plata un estudio en 718 mujeres reveló una prevalencia para HPV16 del 35% (Abba et al., 2003).

En Chaco, un trabajo que se llevó adelante en pacientes con alteraciones cervicales reportó que las frecuencias para HPV16 en LIEBG y LIEAG fueron de 16,8% y 36,2%, respectivamente (Deluca et al., 2013); asimismo, mostró aumentos muy significativos de prevalencia a medida que aumentaba la gravedad de la lesión cervical, al igual que en esta investigación donde se pasó de un 19,9% en \leq LIEBG a un 63,2% en \geq LIEAG.

Es importante destacar que en el presente estudio, las muestras analizadas se seleccionaron a partir de un grupo de muestras positivas en el tamizaje empleando la prueba HPV-AR por Cobas 4800, como se describió anteriormente. Por tanto, hay que considerar que esta tasa de infección por HPV no representa la verdadera prevalencia en mujeres sometidas a tamizaje de CCU, en las que se detectó ADN del HPV-AR en aproximadamente el 15,3%.

Una investigación reciente en adolescentes sexualmente activas entre 15 y 17 años realizada por el laboratorio donde se llevó adelante este trabajo, encontró que los seis tipos de HPV-AR más comúnmente hallados son HPV16 (11,1%), HPV52 (10,8%), HPV56 (8,3%), HPV51 (7,4%), HPV58 (7,3%) y HPV31 (7,1%) (González et al., 2020). Los 3 primeros tipos reportados coinciden con los hallados en este trabajo cuando se evalúa la población general HPV-AR positiva, HPV16 (25,7%), HPV52 (12,5%), HPV56 (12,5%), luego el HPV51 (6,5%) aparece en la posición 11 de frecuencias, el HPV58 (8,6%) en la posición 6, el HPV31 (12,0%) en la posición 4. Las variaciones de frecuencia, y la no aparición de HPV18 en los primeros puestos de prevalencia en adolescentes sugiere la importancia de los mecanismos de clarificación del sistema inmune dependiendo el tipo viral; confirmando que el HPV16 y HPV18 muestran una mayor tendencia a persistir con una ventaja selectiva para replicarse, mantenerse activos y transmitirse, lo que se asocia a su elevado potencial oncogénico (Khan et al., 2005; Schiffman et al., 2010).

Estudios como este, sobre la prevalencia y distribución de los genotipos de HPV proporcionan la base para diseñar programas de prevención relacionados al HPV. Por ello, describir el perfil genotípico antes y después de la inmunización contra el HPV es un paso importante en las estrategias de prevención del CCU y sirve para justificar eventualmente la inclusión de más tipos de HPV en las formulas vacunales. Tales decisiones deben incluir una estimación cuidadosa de la eficacia y el costo-beneficio.

Por otro lado, para aumentar tanto la cobertura del tamizaje como el tratamiento del precáncer y CCU, es necesario mejorar los programas de prevención secundaria, ya que fallas en este punto llevan a un diagnóstico tardío o falta de tratamiento oportuno, lo que aumenta la mortalidad (Bray et al., 2018).

Las nuevas técnicas de tamizaje basadas en la detección del HPV-AR representan un cambio en la prevención del CCU y un desafío en la identificación de nuevas pruebas o biomarcadores que permitan diferenciar dentro de las mujeres HPV-AR positivo aquéllas que tienen riesgo de presentar o desarrollar la enfermedad.

Se sabe que la prueba de HPV-AR posee una alta sensibilidad, pero su baja especificidad es la principal limitación que hace necesario el uso de pruebas adicionales que permitan diferenciar las mujeres con infecciones transitorias de las que tienen infecciones persistentes que requieren seguimiento y eventualmente tratamiento. Por ello se evaluó en este

trabajo la prueba OncoE6 como método de triage para la detección de lesiones precancerosas y cáncer (\geq LIEAG) en mujeres con resultado HPV16 y/o 18 positivo, obteniéndose una sensibilidad general para la OncoE6 de 93,3% (95%IC: 82,1-97,7) y la especificidad de 66,7% (95%IC: 54,9-76,6), lo que conlleva a un VPP de 64,6% (95%IC: 52,5-75,1).

En un estudio publicado recientemente en Honduras, cuando se restringe el análisis a casos con las mismas características que se analizan en esta tesis, se obtiene una sensibilidad del 96,8% y especificidad de 78,9 (Ferrera et al., 2019); la sensibilidad es similar a la obtenida en el presente trabajo de tesis, pero la especificidad es levemente mayor. Esto puede deberse a que aquél análisis contó con un número limitado casos con diagnóstico \leq LIEBG HPV16 y/o18 positivos (n=19) comparado con el nuestro (n=69).

Un estudio realizado en China sobre 1.646 muestras con distintos diagnósticos clínicos (919 histología normal, 69 NIC1, 53 NIC2, 91 NIC3, 474 carcinomas de células escamosas y 40 casos de adenocarcinoma), obtuvo 77,7% de sensibilidad y 91,0% de especificidad en lesiones NIC3 y más graves, dentro de las mujeres HPV-AR positivas por Cobas 4800 (Yu et al., 2018). La especificidad reportada es bastante mayor a la obtenida en esta tesis; esto podría deberse a que el análisis de China incluyó un gran número de muestras (n=204) con resultado Cobas positivo para “Otros HPV-AR” y negativos para “HPV16” y “HPV18”, lo que hace esperable que resulten negativas para el test OncoE6, aumentando de esta manera el valor de especificidad.

Estas publicaciones al igual que el presente trabajo coinciden en que la positividad para OncoE6 aumenta significativamente con el incremento de la gravedad del diagnóstico, lo que está en línea con su mayor VPP respecto de los test de HPV-AR.

Adicionalmente, en el presente trabajo se observa, una tendencia al aumento de la sensibilidad cuando se restringe el análisis a infecciones simples con HPV16 o 18, ya sea haciendo restricciones por edad o no; esto mismo fue informado por Wu y col. en un trabajo que incluyó 1.687 mujeres (Wu et al., 2019). Varios estudios previos concluyeron que la enfermedad cervical es causada por un genotipo de HPV único. Entre ellos, Quint y col. usando micro-disección de captura con láser y genotipificación de HPV por PCR en lesiones cervicales, demostraron que la mayoría de las lesiones contenían solo un genotipo de HPV, lo que indicaría que “un virus, produce una lesión” (Quint et al., 2012). Por lo tanto, los dos casos analizados

que resultaron negativos para OncoE6, donde había co-infecciones y LIEAG, podrían haberse debido a que la lesión fue generada por otros HPV-AR que se encontraban co-infectado.

Además, la prueba fue positiva en el 50% sujetos con HPV 16 y/o 18 positivo pero sin lesiones durante la evaluación inicial; este resultado es indicativo de la necesidad de seguimiento estrecho de estas pacientes, ya que en varios estudios se ha sugerido que un resultado positivo puede ser un indicador importante, incluso después de una colposcopia negativa, de una persistencia viral (Ferrera et al., 2019; Schweizer et al., 2010). Ferrera y col refieren que en las mujeres de mayor edad aumenta el VPP del método; sin embargo, en nuestro análisis debido al bajo número de muestras resultante en cada grupo etario no fue posible obtener valores concluyentes al respecto (Ferrera et al., 2019).

Para poder tener una mejor interpretación de las características del ensayo OncoE6 es importante incrementar la cantidad de lesiones graves evaluadas para poder así obtener un valor más certero de sensibilidad. En este sentido, la inclusión de más casos de cáncer HPV16/18 positivos sería importante para demostrar que la mayoría de estos tendrían expresión de la proteína E6; de esta manera en el estudio se podría demostrar que si bien la mayoría, no todos los casos NIC3 expresan E6 y sólo una fracción de estos últimos progresan a cáncer, lo que sería una explicación biológica plausible.

En este trabajo, el alto porcentaje de mujeres con un resultado negativo para la prueba, dentro de las mujeres sin enfermedad grave, apoya la alta especificidad de la prueba, tal como se ha demostrado en otros estudios (Ferrera et al., 2019; Wu et al., 2019; Yu et al., 2016; Zhao et al., 2013). El desarrollo de pruebas moleculares altamente específicas abre la posibilidad de discriminar las mujeres HPV-AR positivo en el tamizaje que realmente tienen lesiones precancerosas y CCU. La prueba de HPV-AR a pesar de ser altamente sensible para la detección de lesiones de alto grado es poco específica (Cuzick et al., 2012), por tanto su uso como prueba única en el tamizaje, conduciría a un aumento en el número de colposcopias y tratamientos innecesarios; mientras que la aplicación de una prueba de triage altamente específica limitaría la cantidad de derivaciones evitando la sobrecarga del sistema de salud.

En resumen, el presente estudio aporta valiosa información para la salud pública en relación a la prevalencia tipo-específica de HPV en mujeres con y sin lesión cervical; estos datos permiten la construcción de una línea basal que estará disponible para la futura evaluación del impacto de la vacunación contra HPV en este grupo etario. Además, se trata del primer

trabajo realizado en Argentina que evalúa la expresión de la oncoproteína E6 empleando la prueba OncoE6 de HPV16/18; la alta especificidad obtenida, suma evidencia a favor del posible uso de esta prueba como ensayo de triage en mujeres HPV-AR positivas, lo que podría significar una novedosa herramienta que beneficie al Programa Nacional de Prevención de Cáncer Cérvico-uterino.

6. CONCLUSIONES

Los principales aportes que destacan a este trabajo se fundamentan en que:

- 1) Brinda información sobre la distribución de los genotipos de HPV en mujeres residentes en el oeste del conurbano bonaerense, con y sin lesiones cervicales, seleccionadas en un contexto de tamizaje.
- 2) Confirma la gran diversidad de tipos virales (tanto de alto como de bajo riesgo oncogénico) en la citología normal, y LIEBG; mientras que en las LIEAG y CCU el espectro viral es más restringido, con franco predominio de los HPV-AR, en especial HPV16, seguido por HPV31, 58 y 18 (98,5%). Esto corrobora las bases de la carcinogénesis inducida por HPV-AR, en especial en el cuello uterino.
- 3) Permite construir una línea basal de prevalencia tipo-específica en mujeres no vacunadas, dentro del contexto del tamizaje, contra la cual comparar futuras mediciones en grupos similares, pero beneficiadas por la vacunación. La medición del impacto de la vacunación podría ayudar a sostener y mejorar la inmunización, como así también predecir el efecto sobre las lesiones precancerosas y el CCU, lo cual favorecería la prevención secundaria.
- 4) Implementa y evalúa por primera vez en Argentina la prueba OncoE6; la alta especificidad obtenida, suma evidencia a favor del uso de esta prueba como ensayo de triage en mujeres HPV positivas en el tamizaje. Esto podría significar una novedosa herramienta para optimizar la prevención secundaria del CCU, ya que permitiría identificar aquéllas mujeres portadoras de una enfermedad que requiera tratamiento (mayor valor predictivo positivo).
- 5) Presenta un alto valor sanitario al poner a disposición de los programas del Ministerio de Salud responsables de la prevención primaria y secundaria, información valiosa y novedosa en relación a la infección por HPV y sus lesiones asociadas.
- 6) Corrobora la riqueza de un trabajo multidisciplinario realizado mediante la interacción entre especialistas de distintas áreas de la biomedicina e instituciones nacionales e internacionales (médicos ginecólogos, patólogos, epidemiólogos y virólogos).

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Las perspectivas a futuro planteadas a partir de los resultados de esta tesis se orientan en los siguientes aspectos:

- Analizar el seguimiento a 18 meses de las pacientes sin lesión que tuvieron resultado positivo para la OncoE6, a fin de evaluar si esta positividad se asocia a la persistencia viral y progresión a lesiones más graves.
- Avanzar con la implementación de la nueva prueba, que permitiría detectar las oncoproteínas E6 y E7 de 8 tipos de HPV-AR (HPV tipos 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58); de esta manera se ampliaría a más del 90% el espectro de lesiones evaluables, fortaleciendo el impacto del ensayo.
- Considerar la posibilidad de realizar la evaluación de otras herramientas de triage (expresión de proteínas celulares p16/Ki67, metilación viral y celular, serología), investigaciones de patogenia y variabilidad genética viral, como así también diversos biomarcadores genómicos y transcriptómicos de posible utilidad clínica, aprovechando el valioso biobanco que ha generado el proyecto ESTAMPA, junto con la amplia información de cada paciente registrada en la base de datos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abba, M.C., Gomez, M.A., Golijow, C.D., 2003. [Human papillomavirus genotype distribution in cervical infections among woman in La Plata, Argentina]. *Rev. Argent. Microbiol.* 35, 74–79.
- Almonte, M., Murillo, R., Sánchez, G.I., González, P., Ferrera, A., Picconi, M.A., Wiesner, C., Cruz-Valdez, A., Lazcano-Ponce, E., Jerónimo, J., Ferreccio, C., Kasamatsu, E., Mendoza, L., Rodríguez, G., Calderón, A., Venegas, G., Villagra, V., Tatti, S., Fleider, L., Terán, C., Baena, A., Hernández, M. de la L., Rol, M.L., Lucas, E., Barbier, S., Ramírez, A.T., Arrossi, S., Rodríguez, M.I., González, E., Celis, M., Martínez, S., Salgado, Y., Ortega, M., Beracochea, A.V., Pérez, N., Rodríguez de la Peña, M., Ramón, M., Hernández-Nevarez, P., Arboleda-Naranjo, M., Cabrera, Y., Salgado, B., García, L., Retana, M.A., Colucci, M.C., Arias-Stella, J., Bellido-Fuentes, Y., Bobadilla, M.L., Olmedo, G., Brito-García, I., Méndez-Herrera, A., Cardinal, L., Flores, B., Peñaranda, J., Martínez-Better, J., Soilán, A., Figueroa, J., Caserta, B., Sosa, C., Moreno, A., Mural, J., Doimi, F., Giménez, D., Rodríguez, H., Lora, O., Luciani, S., Broutet, N., Darragh, T., Herrero, R., 2020. Multicentric study of cervical cancer screening with human papillomavirus testing and assessment of triage methods in Latin America: the ESTAMPA screening study protocol. *BMJ Open* 10, e035796. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-035796>
- Almonte, M., Murillo, R., Sánchez, G.I., Jerónimo, J., Salmerón, J., Ferreccio, C., Lazcano-Ponce, E., Herrero, R., 2010. Nuevos paradigmas y desafíos en la prevención y control del cáncer de cuello uterino en América Latina. *Salud pública Méx* 52, 544–559. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342010000600010>
- Antinore, M.J., Birrer, M.J., Patel, D., Nader, L., McCance, D.J., 1996. The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *EMBO J.* 15, 1950–1960.
- Arbyn, M., Ronco, G., Anttila, A., Meijer, C.J.L.M., Poljak, M., Ogilvie, G., Koliopoulos, G., Naucler, P., Sankaranarayanan, R., Peto, J., 2012. Evidence Regarding Human Papillomavirus Testing in Secondary Prevention of Cervical Cancer. *Vaccine* 30, F88–F99. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.095>
- Bernard, H.-U., Burk, R.D., Chen, Z., van Doorslaer, K., Hausen, H. zur, de Villiers, E.-M., 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.002>
- Bernard, H.-U., Calleja-Macias, I.E., Dunn, S.T., 2006. Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *Int. J. Cancer* 118, 1071–1076. <https://doi.org/10.1002/ijc.21655>
- Bosch, F.X., Burchell, A.N., Schiffman, M., Giuliano, A.R., de Sanjose, S., Bruni, L., Tortolero-Luna, G., Kjaer, S.K., Muñoz, N., 2008. Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections and Type-Specific Implications in Cervical Neoplasia. *Vaccine* 26, K1–K16. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.05.064>
- Bosch, F.X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C.J.L.M., Shah, K.V., 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology* 55, 244–265. <https://doi.org/10.1136/jcp.55.4.244>

- Bosch, F.X., Manos, M.M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A.M., Peto, J., Schiffman, M.H., Moreno, V., Kurman, R., Shan, K.V., International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group, 1995. Prevalence of Human Papillomavirus in Cervical Cancer: a Worldwide Perspective. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 87, 796–802. <https://doi.org/10.1093/jnci/87.11.796>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A., 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Bruni, L., Diaz, M., Castellsagué, X., Ferrer, E., Bosch, F.X., de Sanjosé, S., 2010. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J. Infect. Dis.* 202, 1789–1799. <https://doi.org/10.1086/657321>
- Burd, E.M., 2016. Human Papillomavirus Laboratory Testing: the Changing Paradigm. *Clin. Microbiol. Rev.* 29, 291–319. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-15>
- Burd, E.M., 2003. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 1–17. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.1.1-17.2003>
- Castle, P.E., Schiffman, M., Wheeler, C.M., Wentzensen, N., Gravitt, P.E., 2010. Impact of Improved Classification on the Association of Human Papillomavirus With Cervical Precancer. *American Journal of Epidemiology* 171, 155–163. <https://doi.org/10.1093/aje/kwp390>
- CDC, 2020. HPV Diseases and Cancers [WWW Document]. URL <https://www.cdc.gov/hpv/parents/cancer.html> (accessed 3.26.20).
- Chan, P.K.S., Picconi, M.A., Cheung, T.H., Giovannelli, L., Park, J.S., 2012. Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing. *Crit Rev Clin Lab Sci* 49, 117–136. <https://doi.org/10.3109/10408363.2012.707174>
- Chen, Z., Schiffman, M., Herrero, R., DeSalle, R., Anastos, K., Segondy, M., Sahasrabudde, V.V., Gravitt, P.E., Hsing, A.W., Chan, P.K.S., Burk, R.D., 2018. Classification and evolution of human papillomavirus genome variants: Alpha-5 (HPV26, 51, 69, 82), Alpha-6 (HPV30, 53, 56, 66), Alpha-11 (HPV34, 73), Alpha-13 (HPV54) and Alpha-3 (HPV61). *Virology* 516, 86–101. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.01.002>
- Ciapponi, A., Bardach, A., Glujovsky, D., Gibbons, L., Picconi, M.A., 2011. Type-specific HPV prevalence in cervical cancer and high-grade lesions in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 6, e25493. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025493>
- Cohen, J.F., Korevaar, D.A., Altman, D.G., Bruns, D.E., Gatsonis, C.A., Hooft, L., Irwig, L., Levine, D., Reitsma, J.B., de Vet, H.C.W., Bossuyt, P.M.M., 2016. STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies: explanation and elaboration. *BMJ Open* 6, e012799. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-012799>
- Cutts, F., 2007. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. *Bull World Health Organ* 85, 719–726. <https://doi.org/10.2471/BLT.06.038414>
- Cuzick, J., Arbyn, M., Sankaranarayanan, R., Tsu, V., Ronco, G., Mayrand, M.-H., Dillner, J., Meijer, C.J.L.M., 2008. Overview of Human Papillomavirus-Based and Other Novel Options for Cervical Cancer Screening in Developed and Developing Countries. *Vaccine* 26, K29–K41. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.06.019>
- Cuzick, J., Bergeron, C., von Knebel Doeberitz, M., Gravitt, P., Jeronimo, J., Lorincz, A.T., J L M Meijer, C., Sankaranarayanan, R., J F Snijders, P., Szarewski, A., 2012. New

- technologies and procedures for cervical cancer screening. *Vaccine* 30 Suppl 5, F107-116. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.05.088>
- de Sanjosé, S., Brotons, M., Pavón, M.A., 2018a. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 47, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.08.015>
- de Sanjose, S., Quint, W.G., Alemany, L., Geraets, D.T., Klaustermeier, J.E., Lloveras, B., Tous, S., Felix, A., Bravo, L.E., Shin, H.-R., Vallejos, C.S., de Ruiz, P.A., Lima, M.A., Guimera, N., Clavero, O., Alejo, M., Llombart-Bosch, A., Cheng-Yang, C., Tatti, S.A., Kasamatsu, E., Iljazovic, E., Odida, M., Prado, R., Seoud, M., Grce, M., Usubutun, A., Jain, A., Suarez, G.A.H., Lombardi, L.E., Banjo, A., Menéndez, C., Domingo, E.J., Velasco, J., Nessa, A., Chichareon, S.C.B., Qiao, Y.L., Lerma, E., Garland, S.M., Sasagawa, T., Ferrera, A., Hammouda, D., Mariani, L., Pelayo, A., Steiner, I., Oliva, E., Meijer, C.J., Al-Jassar, W.F., Cruz, E., Wright, T.C., Puras, A., Llave, C.L., Tzardi, M., Agorastos, T., Garcia-Barriola, V., Clavel, C., Ordi, J., Andújar, M., Castellsagué, X., Sánchez, G.I., Nowakowski, A.M., Bornstein, J., Muñoz, N., Bosch, F.X., 2010. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The Lancet Oncology* 11, 1048–1056. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70230-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70230-8)
- de Sanjosé, S., Serrano, B., Tous, S., Alejo, M., Lloveras, B., Quirós, B., Clavero, O., Vidal, A., Ferrándiz-Pulido, C., Pavón, M.Á., Holzinger, D., Halc, G., Tommasino, M., Quint, W., Pawlita, M., Muñoz, N., Bosch, F.X., Alemany, L., RIS HPV TT, VVAP and Head and Neck study groups, Kulkarni, A., 2018b. Burden of Human Papillomavirus (HPV)-Related Cancers Attributable to HPVs 6/11/16/18/31/33/45/52 and 58. *JNCI Cancer Spectrum* 2, pky045. <https://doi.org/10.1093/jncics/pky045>
- de Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.-U., zur Hausen, H., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>
- Delgado, D., Marín, J.M., de Diego, J., Guerra, S., González, B., Barrios, J.L., Canut, A., 2012. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in women with abnormal cervical cytology in the Basque Country, Spain. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 30, 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.10.021>
- Deluca, G.D., Basiletti, J., González, J.V., Díaz Vásquez, N., Lucero, R.H., Picconi, M.A., 2012. Human papilloma virus risk factors for infection and genotype distribution in aboriginal women from Northern Argentina. *Medicina (B Aires)* 72, 461–466.
- Deluca, G.D., Marin, H.M., Blanco, N.S., Basiletti, J.A., González, J.V., Merino, A.L., Picconi, M.A., 2013. Distribution of human papillomavirus genotypes in women with cervical alterations from north Argentina. *Indian J Med Microbiol* 31, 138–141. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.115228>
- Denny, L., 2012. Cytological screening for cervical cancer prevention. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 26, 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2011.08.001>
- Denny, L., de Sanjose, S., Mutebi, M., Anderson, B.O., Kim, J., Jeronimo, J., Herrero, R., Yeates, K., Ginsburg, O., Sankaranarayanan, R., 2017. Interventions to close the divide for women with breast and cervical cancer between low-income and middle-income countries and high-income countries. *The Lancet* 389, 861–870. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31795-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31795-0)

- Doorbar, J., 2007. Papillomavirus Life Cycle Organization and Biomarker Selection. *Disease Markers* 23, 297–313. <https://doi.org/10.1155/2007/613150>
- Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C., Murakami, I., 2015. Human papillomavirus molecular biology and disease association: Human papillomavirus. *Rev. Med. Virol.* 25, 2–23. <https://doi.org/10.1002/rmv.1822>
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I.G., Stoler, M., Broker, T.R., Stanley, M.A., 2012. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine* 30, F55–F70. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>
- Ferrera, A., Valladares, W., Cabrera, Y., Hernandez, M., Darragh, T., Baena, A., Almonte, M., Herrero, R., 2019. Performance of an HPV 16/18 E6 oncoprotein test for detection of cervical precancer and cancer. *Int. J. Cancer* 145, 2042–2050. <https://doi.org/10.1002/ijc.32156>
- Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., 2007. *Fields virology.*, 5th ed. ed. Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Franceschi, S., Herrero, R., Clifford, G.M., Snijders, P.J.F., Arslan, A., Anh, P.T.H., Bosch, F.X., Ferreccio, C., Hieu, N.T., Lazcano-Ponce, E., Matos, E., Molano, M., Qiao, Y.-L., Rajkumar, R., Ronco, G., de Sanjosé, S., Shin, H.-R., Sukvirach, S., Thomas, J.O., Meijer, C.J.L.M., Muñoz, N., and the IARC HPV Prevalence Surveys Study Group, 2006. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int. J. Cancer* 119, 2677–2684. <https://doi.org/10.1002/ijc.22241>
- Ganguly, N., Parihar, S.P., 2009. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J. Biosci.* 34, 113–123. <https://doi.org/10.1007/s12038-009-0013-7>
- González, J.V., Deluca, G.D., Liotta, D.J., Correa, R.M., Basiletti, J.A., Colucci, M.C., Katz, N., Vizzotti, C., Picconi, M.A., MALBRAN HPV Surveillance Study Group, MALBRAN HPV Surveillance Study Group, 2020. Baseline prevalence and type distribution of Human papillomavirus in sexually active non-vaccinated adolescent girls from Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.06.004>
- Gordis, L., 2013. *Epidemiology*, 5th ed. ed. ELSEVIER.
- Herfs, M., Vargas, S.O., Yamamoto, Y., Howitt, B.E., Nucci, M.R., Hornick, J.L., McKeon, F.D., Xian, W., Crum, C.P., 2013. A novel blueprint for ‘top down’ differentiation defines the cervical squamocolumnar junction during development, reproductive life, and neoplasia: Evolution of the cervical squamocolumnar junction. *J. Pathol* 229, 460–468. <https://doi.org/10.1002/path.4110>
- Herrero, R., Castle, P.E., Schiffman, M., Bratti, M.C., Hildesheim, A., Morales, J., Alfaro, M., Sherman, M.E., Wacholder, S., Chen, S., Rodriguez, A.C., Burk, R.D., 2005. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J. Infect. Dis.* 191, 1796–1807. <https://doi.org/10.1086/428850>
- IARC, 2007. Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 90, 1–636.
- INC, 2019. Mortalidad por cáncer cervicouterino - Instituto Nacional del Cáncer (INC) [WWW Document]. URL <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/mortalidad> (accessed 3.26.20).
- INC, 2018. Programa Nacional de Prevención de Cáncer Cervicouterino [WWW Document]. URL <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/institucional/pnpcc> (accessed 3.26.20).
- Insinga, R.P., Perez, G., Wheeler, C.M., Koutsky, L.A., Garland, S.M., Leodolter, S., Joura, E.A., Ferris, D.G., Steben, M., Hernandez-Avila, M., Brown, D.R., Elbasha, E., Munoz,

- N., Paavonen, J., Haupt, R.M., for the FUTURE I Investigators, 2011. Incident Cervical HPV Infections in Young Women: Transition Probabilities for CIN and Infection Clearance. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 20, 287–296. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0791>
- Karolinska Institutet, 2020. International Humanpapillovirus (HPV) Reference Center [WWW Document]. URL https://www.hpvcenter.se/human_reference_clones/ (accessed 3.27.20).
- Khan, M.J., Castle, P.E., Lorincz, A.T., Wacholder, S., Sherman, M., Scott, D.R., Rush, B.B., Glass, A.G., Schiffman, M., 2005. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J. Natl. Cancer Inst.* 97, 1072–1079. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji187>
- Kitchener, H.C., Castle, P.E., Cox, J.T., 2006. Chapter 7: Achievements and limitations of cervical cytology screening. *Vaccine* 24, S63–S70. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.113>
- Kjaer, S.K., Breugelmans, G., Munk, C., Junge, J., Watson, M., Iftner, T., 2008. Population-based prevalence, type- and age-specific distribution of HPV in women before introduction of an HPV-vaccination program in Denmark. *Int. J. Cancer* 123, 1864–1870. <https://doi.org/10.1002/ijc.23712>
- Li, N., Franceschi, S., Howell-Jones, R., Snijders, P.J.F., Clifford, G.M., 2011. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int. J. Cancer* 128, 927–935. <https://doi.org/10.1002/ijc.25396>
- López-Ocejo, O., Vilorio-Petit, A., Bequet-Romero, M., Mukhopadhyay, D., Rak, J., Kerbel, R.S., 2000. Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. *Oncogene* 19, 4611–4620. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203817>
- Meijer, C.J.L.M., Berkhof, H., Heideman, D. a. M., Hesselink, A.T., Snijders, P.J.F., 2009. Validation of high-risk HPV tests for primary cervical screening. *J. Clin. Virol.* 46 Suppl 3, S1-4. [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(09\)00540-X](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(09)00540-X)
- Münger, K., Baldwin, A., Edwards, K.M., Hayakawa, H., Nguyen, C.L., Owens, M., Grace, M., Huh, K., 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J. Virol.* 78, 11451–11460. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.21.11451-11460.2004>
- Muñoz, N., Bosch, F.X., Castellsagué, X., Díaz, M., de Sanjose, S., Hammouda, D., Shah, K.V., Meijer, C.J.L.M., 2004. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? the international perspective: HPV Types for Vaccines and Screening Tests. *Int. J. Cancer* 111, 278–285. <https://doi.org/10.1002/ijc.20244>
- Muñoz, N., Bosch, F.X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K.V., Snijders, P.J.F., Meijer, C.J.L.M., International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group, 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 348, 518–527. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021641>
- Muñoz, N., Castellsagué, X., de González, A.B., Gissmann, L., 2006. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24 Suppl 3, S3/1-10. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.115>
- Otero-Motta, A.P., Ordóñez, J.L., González-Celador, R., Rivas, B., Macías, M.D.C.G., Bullón, A., Abad, M.D.M., 2011. Prevalence of human papillomavirus genotypes in cytologic

- abnormalities from unvaccinated women living in north-western Spain. *APMIS* 119, 204–215. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2010.02711.x>
- PAHO, O.P. de la S., 2016. Sección 2: Resumen de las pruebas de VPH disponibles, in: Incorporación de la prueba del virus del papiloma humano en programas de prevención de cáncer cervicouterino. Manual para gerentes de programas de salud. p. 77.
- Papanicolaou, G.N., 1957. The Cancer-Diagnostic Potential of Uterine Exfoliative Cytology. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 7, 124–135. <https://doi.org/10.3322/canjclin.7.4.124>
- Picconi, M.A., 2013. [Human papillomavirus detection in cervical cancer prevention]. *Medicina (B Aires)* 73, 585–596.
- Pim, D., Banks, L., 2010. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses: HIGH- AND LOW-RISK HPV TARGETS. *APMIS* 118, 471–493. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2010.02618.x>
- Quint, W., Jenkins, D., Molijn, A., Struijk, L., van de Sandt, M., Doorbar, J., Mols, J., Van Hoof, C., Hardt, K., Struyf, F., Colau, B., 2012. One virus, one lesion-individual components of CIN lesions contain a specific HPV type. *J. Pathol.* 227, 62–71. <https://doi.org/10.1002/path.3970>
- Ramirez-Pineda, A.T., González, M.I., Castañeda-Vanegas, K.M., Agudelo-Fernández, M.C., López-Urán, C., Sánchez-Vásquez, G.I., 2019. Filogenia y oncogénesis del virus del papiloma humano: una aproximación translacional al descubrimiento de biomarcadores para la detección de lesiones precancerosas de cérvix. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.* 43, 351–365. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.792>
- Roman, A., Munger, K., 2013. The papillomavirus E7 proteins. *Virology* 445, 138–168. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.013>
- Rovers, 2020. Cervex-Brush® [WWW Document]. URL <https://www.roversmedicaldevices.com/cell-sampling-devices/cervex-brush/> (accessed 4.4.20).
- Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D., Howley, P.M., 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495–505. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90384-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90384-3)
- Schiffman, M., Castle, P.E., Jeronimo, J., Rodriguez, A.C., Wacholder, S., 2007. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet* 370, 890–907. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61416-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61416-0)
- Schiffman, M., Herrero, R., DeSalle, R., Hildesheim, A., Wacholder, S., Cecilia Rodriguez, A., Bratti, M.C., Sherman, M.E., Morales, J., Guillen, D., Alfaro, M., Hutchinson, M., Wright, T.C., Solomon, D., Chen, Z., Schussler, J., Castle, P.E., Burk, R.D., 2005. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 337, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.04.002>
- Schiffman, M., Rodriguez, A.C., Chen, Z., Wacholder, S., Herrero, R., Hildesheim, A., Desalle, R., Befano, B., Yu, K., Safaeian, M., Sherman, M.E., Morales, J., Guillen, D., Alfaro, M., Hutchinson, M., Solomon, D., Castle, P.E., Burk, R.D., 2010. A Population-Based Prospective Study of Carcinogenic Human Papillomavirus Variant Lineages, Viral Persistence, and Cervical Neoplasia. *Cancer Research* 70, 3159–3169. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4179>

- Schiller, J.T., Castellsagué, X., Villa, L.L., Hildesheim, A., 2008. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine* 26 Suppl 10, K53-61. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.06.002>
- Schmitt, M., Dondog, B., Waterboer, T., Pawlita, M., 2008. Homogeneous Amplification of Genital Human Alpha Papillomaviruses by PCR Using Novel Broad-Spectrum GP5+ and GP6+ Primers. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 1050–1059. <https://doi.org/10.1128/JCM.02227-07>
- Schweizer, J., Lu, P.S., Mahoney, C.W., Berard-Bergery, M., Ho, M., Ramasamy, V., Silver, J.E., Bisht, A., Labiad, Y., Peck, R.B., Lim, J., Jeronimo, J., Howard, R., Gravitt, P.E., Castle, P.E., 2010. Feasibility Study of a Human Papillomavirus E6 Oncoprotein Test for Diagnosis of Cervical Precancer and Cancer. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4646–4648. <https://doi.org/10.1128/JCM.01315-10>
- Snijders, P.J.F., Heideman, D.A.M., Meijer, C.J.L.M., 2010. Methods for HPV detection in exfoliated cell and tissue specimens. *APMIS* 118, 520–528. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2010.02621.x>
- Stanley, M., 2010. HPV - immune response to infection and vaccination. *Infect. Agents Cancer* 5, 19. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-5-19>
- Stanley, M.A., 2012. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 215–222. <https://doi.org/10.1128/CMR.05028-11>
- Stoler, M.H., 2000. Human Papillomaviruses and Cervical Neoplasia: A Model for Carcinogenesis: *International Journal of Gynecological Pathology* 19, 16–28. <https://doi.org/10.1097/00004347-200001000-00004>
- Syrjänen, S.M., Syrjänen, K.J., 1999. New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Ann. Med.* 31, 175–187. <https://doi.org/10.3109/07853899909115976>
- Tonon, S.A., Picconi, M.A., Zinovich, J.B., Nardari, W., Mampaey, M., Galuppo, J.A., Bos, P.D., Badano, I., Di Lello, F.A., Basiletti, J., González, J.V., Alonio, L.V., Teysié, A.R., 2003. [Prevalence of cervical infection by human papilloma virus (HPV) in the Caucasian and Guaraní populations residing in the province of Misiones, Argentina]. *Rev. Argent. Microbiol.* 35, 205–213.
- Trottier, H., Franco, E.L., 2006. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 Suppl 1, S1-15. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.09.054>
- Vaccarella, S., Laversanne, M., Ferlay, J., Bray, F., 2017. Cervical cancer in Africa, Latin America and the Caribbean and Asia: Regional inequalities and changing trends: Cervical cancer in Africa, Latin America and the Caribbean and Asia. *Int. J. Cancer* 141, 1997–2001. <https://doi.org/10.1002/ijc.30901>
- van den Brule, A.J.C., Pol, R., Fransen-Daalmeijer, N., Schouls, L.M., Meijer, C.J.L.M., Snijders, P.J.F., 2002. GP5+/6+ PCR followed by Reverse Line Blot Analysis Enables Rapid and High-Throughput Identification of Human Papillomavirus Genotypes. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 779–787. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.3.779-787.2002>
- Van Doorslaer, K., Bernard, H.-U., Chen, Z., de Villiers, E.-M., Hausen, H. zur, Burk, R.D., 2011. Papillomaviruses: evolution, Linnaean taxonomy and current nomenclature. *Trends in Microbiology* 19, 49–50. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.11.004>
- Vande Pol, S.B., Klingelutz, A.J., 2013. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology* 445, 115–137. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.026>
- Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J., Muñoz, N., 1999. Human papillomavirus is a

- necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189, 12–19. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199909\)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F)
- WHO, 2020. Lanzamiento de la Estrategia mundial para acelerar la eliminación del cáncer del cuello uterino [WWW Document]. URL <https://www.who.int/es/news-room/events/detail/2020/11/17/default-calendar/launch-of-the-global-strategy-to-accelerate-the-elimination-of-cervical-cancer> (accessed 11.25.20).
- WHO, 2017. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, May 2017–Recommendations. *Vaccine* 35, 5753–5755. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.05.069>
- WHO, W.H.O., 2019. Accelerating the elimination of cervical cancer as a global public health problem.
- Wu, Z., Li, T.-Y., Jiang, M., Yu, L., Zhao, J., Wang, H., Zhang, X., Chen, W., Qiao, Y., 2019. Human Papillomavirus (HPV) 16/18 E6 Oncoprotein Expression in Infections with Single and Multiple Genotypes. *Cancer Prev Res* 12, 95–102. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-18-0343>
- Yeo-Teh, N., Ito, Y., Jha, S., 2018. High-Risk Human Papillomaviral Oncogenes E6 and E7 Target Key Cellular Pathways to Achieve Oncogenesis. *IJMS* 19, 1706. <https://doi.org/10.3390/ijms19061706>
- Yu, L., Jiang, M., Qu, P., Wu, Z., Sun, P., Xi, M., Qin, Y., Liu, X., Liao, G., Lei, X., Sun, L., Zhang, Y., Li, Z., Chen, W., Qiao, Y.-L., 2018. Clinical evaluation of human papillomavirus 16/18 oncoprotein test for cervical cancer screening and HPV positive women triage: Evaluation of OncoE6 for screening and triage. *Int. J. Cancer* 143, 813–822. <https://doi.org/10.1002/ijc.31368>
- Yu, L.-L., Kang, L.-N., Zhao, F.-H., Lei, X.-Q., Qin, Y., Wu, Z.-N., Wang, H., Chen, W., Qiao, Y.-L., 2016. Elevated Expression of Human Papillomavirus-16/18 E6 Oncoprotein Associates with Persistence of Viral Infection: A 3-Year Prospective Study in China. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 25, 1167–1174. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-1057>
- Zhao, F.-H., Jeronimo, J., Qiao, Y.-L., Schweizer, J., Chen, W., Valdez, M., Lu, P., Zhang, X., Kang, L.-N., Bansil, P., Paul, P., Mahoney, C., Berard-Bergery, M., Bai, P., Peck, R., Li, J., Chen, F., Stoler, M.H., Castle, P.E., 2013. An Evaluation of Novel, Lower-Cost Molecular Screening Tests for Human Papillomavirus in Rural China. *Cancer Prevention Research* 6, 938–948. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-13-0091>
- Zsemlye, M., 2013. LSIL. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 40, 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2013.03.008>
- zur Hausen, H., 1996. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta* 1288, F55-78. [https://doi.org/10.1016/0304-419x\(96\)00020-0](https://doi.org/10.1016/0304-419x(96)00020-0)

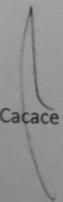
9. ANEXOS

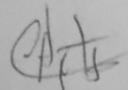
9.1. Anexo 1: Resolución del comité de ética

COMITÉ DE BIOÉTICA "Dr. Vicente Federico Del Giúdice"
 COMISIÓN DE EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA
 HOSPITAL NACIONAL PROFESOR ALEJANDRO POSADAS

El Palomar, 12 de abril de 2018

<p>COORDINADOR Carlos Apezteguia Médico intensivista Investigador</p> <p>SECRETARIA Noemí Cacace Linares Médica Farmacóloga/Intensivista Diploma Superior en Bioética</p> <p>SECRETARIA DE ACTAS Mirta di Michele Médica neonatóloga Pediatra</p> <p>TITULARES</p> <p>Lidia Albano Médica intensivista pediátrica, Investigadora</p> <p>Pablo Diaz Aguiar Médico internista Auditor</p> <p>Graciela Adrián Lic. en Psicología Mda. en Bioética</p> <p>Juan Librandi Miembro de la comunidad</p> <p>María Clelia Orsi Médica intensivista pediátrica Docente de Bioética (UBA)</p> <p>Santiago Repetto Médico intensivista pediátrico</p> <p>Ma. Fernanda Sabio Prof. en Filosofía Dra. Humanidades Médicas</p> <p>MIEMBRO DE HONOR C. Alicia García Otero Médica oncóloga. Mg. en Ética Aplicada</p>	<p>Sres. Investigadores Dr. Juan Mural Dra. Mercedes Rodríguez de la Peña S_____/____D</p> <p>Protocolo: "Estudio multicéntrico de tamizaje y triage de cáncer de cuello uterino con pruebas del Virus Papiloma Humano (ESTAMPA)" presentado por Dra. Mercedes Rodríguez de la Peña.</p> <p>Código de registro de este protocolo para la CEPIC, ref.: 002 EMIP1Sif/18 (14)</p> <p>La documentación evaluada es la siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nota de los Dres. Mercedes Rodríguez de la Peña y Juan Mural al Comité de Ética donde se informa sobre los cambios realizados a la versión 3.1 del proyecto ESTAMPA 01 pág. • Protocolo versión 3.2 del 02/11/17 (2 ejemplares) 74 pág. • Consentimiento informado versión 3.1 abril 2018 del Hospital Prof. Alejandro Posadas 04 pág. <p>Es una enmienda donde figuran cambios sin relevancia desde el punto de vista ético que incorpora la "autotoma" (muestra recolectada por la propia participante) de la muestra cervical.</p> <p>El protocolo respeta los lineamientos de la Declaración de Helsinki, las Guías de la CIOMS (2016), la Resolución del Ministerio de Salud de la Nación N° 1480/11 así como la Ley 25.326 de protección de datos personales (Habeas Data). Por lo tanto, este comité aprueba el protocolo para ser implementado en este hospital.</p>
--	---


 Noemí Cacace Linares


 Carlos Apezteguia

Pte. Illia s/N, El Palomar (1684), Provincia de Buenos Aires
 Correo electrónico: comitedebioetica@gmail.com
 Teléfono: (011) 4469-9300 interno N° 5207/5214
 FAX: 4469-9210

9.2. Anexo 2: Consentimiento informado.



CONSENTIMIENTO INFORMADO

ESTUDIO ESTAMPA: Estudio multicéntrico de tamizaje y triage de cáncer de cuello uterino con pruebas del Virus de Papiloma Humano (ESTAMPA)

Realizado por: Hospital Nacional Prof. Posadas y ANLIS Malbrán, Ministerio de Salud

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

Introducción

El cáncer de cuello del útero es un problema de salud importante en nuestro país y ha sido muy difícil controlarlo. Es causado por una infección con algunos tipos del virus del Papiloma humano (VPH). Esta infección viral es muy común y las defensas del cuerpo usualmente eliminan la infección durante los dos años siguientes a su adquisición. Sin embargo, algunas mujeres que padecen la infección no la eliminan y podrían desarrollar cáncer. Hasta ahora, para prevenir el cáncer de cuello del útero se utiliza la prueba de la citología, conocida como Papanicolaou y la colposcopia. En este proyecto, estamos investigando nuevas técnicas que serían mejores que el Papanicolaou para detectar lesiones causadas por el VPH, que al ser identificadas precozmente y tratadas adecuadamente, no se convertirán en cáncer de cuello del útero.

¿De qué se trata este estudio?

Este estudio busca evaluar diferentes estrategias para definir cuál de ellas identifica mejor a las mujeres con riesgo de desarrollar cáncer entre aquellas infectadas con el VPH. Invitaremos a cerca de 5.000 mujeres entre los 30 y 64 años de edad en Argentina y también en otros países de Latinoamérica; serán más de 50.000 mujeres en total.

¿Quiénes pueden participar?

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

¿Que implica para mí participar?

Si usted acepta participar, en la primera visita le haremos algunas preguntas acerca de sus datos personales. Además, se le realizará un examen ginecológico y se recolectarán muestras de células de su cuello del útero para detectar la presencia del virus (VPH). La recolección de las muestras es similar a la recolección para el Papanicolaou. Vamos a recolectar tres muestras de células de su cuello del útero durante la primera visita. Usando una de las muestras recolectadas, realizaremos la prueba de VPH. Si su resultado de la **prueba de VPH es negativa**, usted termina su participación en el estudio y por lo tanto debe continuar con sus controles médicos de rutina.

En caso de que la **prueba de VPH resulte positiva**, indicaría que Ud tiene el virus; sin embargo, eso NO significa que Ud esté enferma. Para aclarar esto, Ud debe comprometerse a volver a una segunda visita para un examen más detallado con un

especialista en colposcopia. La colposcopia es una prueba donde un médico especialista examina el cuello del útero a través de la colocación de un líquido (ácido acético 3-5%) y mediante una lente especial con luz puede detectar imágenes anormales y decidir si usted requiere otro estudio y/o tratamiento.

Antes de realizar la colposcopia le haremos algunas preguntas de su historia personal y su estilo de vida, le tomaremos una muestra de células de su cuello del útero y le realizaremos extracción de sangre para análisis de laboratorio (del mismo modo que solicitamos laboratorio de rutina). La muestra de sangre se va a utilizar para estudiar en el futuro nuevos marcadores de la infección por el VPH y enfermedad de cuello del útero. Para saber si usted tiene enfermedad en el cuello del útero y decidir si necesita tratamiento, quizá el ginecólogo necesite tomar una pequeña muestra de tejido llamada **biopsia**. Si la biopsia muestra que usted tiene enfermedad, puede que usted requiera tratamiento, el cual le será explicado por el ginecólogo. En este caso, le solicitamos su autorización para que los tejidos extraídos durante el diagnóstico y el tratamiento puedan ser revisados por especialistas del estudio y eventualmente ser usados para análisis adicionales.

Si usted no requiere tratamiento la invitaremos a un control a los 18 meses después para recolectar muestras para una segunda prueba de VPH; si esta prueba resulta positiva, se repetirá la colposcopia y eventualmente biopsia.

Es posible que usted tenga que asistir a más visitas de colposcopia y que le realicen biopsias con el fin de lograr el diagnóstico y tratamiento adecuado de todas las lesiones que puedan estar presentes en su cuello del útero.

Finalmente le recalamos que su participación es **completamente voluntaria** puede retirarse de este cuando quiera o negarse a participar en cualquier parte del estudio, incluyendo responder preguntas sobre su historia personal y estilo de vida o proveer cualquier muestra a excepción de aquellas que se recolectan en esta primera visita. Esto no afectará los servicios que usted recibe dentro de su sistema de salud.

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

Todos los procedimientos del estudio **son completamente gratuitos**. Usted no pagará, ni recibirá ningún pago por su participación.

¿La información que voy a brindar es confidencial?

Toda la información que brinde, incluyendo los resultados de sus pruebas, será confidencial. Sus muestras no serán marcadas con información que la identifique. Sólo tendrán un código numérico que permitirá asociarlas con sus otros datos (anonimato).

Almacenamiento de las muestras

Las muestras de su cuello uterino y sangre serán parcialmente procesadas en el Hospital Posadas y luego serán enviadas a la ANLIS Malbrán; allí se harán algunos estudios y se almacenarán para futuros estudios. Más adelante algunas de ellas se enviarán a la Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer (IARC por sus siglas en inglés)

perteneciente a la Organización Mundial de la Salud, en Francia, o a otro laboratorio asociado para estudios especiales y almacenamiento a largo plazo.

Le pedimos autorización para usar sus muestras en estas investigaciones futuras para evaluar nuevas estrategias que puedan servir para mejorar la detección temprana del cáncer de cuello del útero.

Ud puede contactarse con el Dr. Mural Juan, Jefe de Servicio de Ginecología o sus colaboradores o a la Dra María Alejandra Picconi, Investigadora Principal Local en caso de requerir mayor información.

¿Cuáles son los beneficios de mi participación?

Los beneficios son:

1. Se le realizarán pruebas nuevas y de alta calidad para la detección de lesiones que podrían convertirse en cáncer de cuello del útero, bajo la supervisión de un equipo internacional de investigadores.
2. Si usted tuviera una lesión en el cuello del útero, nos aseguraremos de que reciba el tratamiento apropiado.

¿Cuáles son los riesgos de mi participación?

Los riesgos son:

1. El examen ginecológico es el mismo al que usted está acostumbrada durante la colocación del espéculo y en la toma del PAP en otros controles previos, con escasa molestia y sangrado leve y ocasional.
2. Durante la colposcopia en ocasiones presentará ardor, que generalmente desaparece espontáneamente luego del examen.
3. Si usted necesita una biopsia puede que le produzca un leve sangrado.
4. En el caso de enfermedad y que usted requiera un LEEP (tratamiento quirúrgico ambulatorio), éste le puede causar sangrado generalmente escaso, molestias mínimas y en algunas ocasiones infección como la mayoría de los procedimientos quirúrgicos mínimamente invasivos.

Instituciones, aprobaciones, seguimientos, preguntas adicionales y futuros contactos

Este estudio está coordinado por la Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer y es realizado en Argentina Buenos Aires por el Hospital Posadas junto con el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas- ANLIS Malbrán.

El protocolo del estudio y el consentimiento informado han sido revisados y aprobados por el Comité de Ética de la Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer, por el Comité de Ética e Investigaciones del Hospital Posadas y por el Comité de Ética de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Si tiene preguntas adicionales puede hacerlas y discutir las con el personal del estudio y contactarse con el Dr. Mural y colaboradores de la Sección de Patología Cervical del Hospital "Prof. Alejandro Posadas" en el teléfono 44699300 internos: 1130,1319,1330; también puede contactar al Comité de Ética (4469-9200 interno 1100 y 1222) y a la Dra. Picconi de la ANLIS Malbrán (TE: 4301-7428/4302-5064, int 217).

He leído el consentimiento informado y este formulario.

Iniciales _____

Y sé lo siguiente:

- Que el Virus del Papiloma Humano (VPH) puede causar cáncer de cuello del útero si la infección no es eliminada por las defensas del cuerpo
- Que actualmente es posible detectar las lesiones en el cuello del útero utilizando una prueba que detecta el VPH
- Que en este estudio se investigarán varias estrategias para detectar las lesiones en el cuello del útero que podrían convertirse en cáncer
- Que como parte de los procedimientos del estudio, se me realizarán pruebas y se recolectarán muestras para investigación
- Que si tengo un resultado positivo en la prueba de VPH, seré invitada a una visita con un especialista en colposcopia, de lo contrario debo continuar mi tamizaje (control) regular dentro de mi sistema de salud.
- Que mis registros médicos podrán ser revisados por el personal del estudio
- Que si recibo tratamiento para lesiones en mi cuello del útero, el tejido extraído en el tratamiento será revisado por un especialista del estudio
- Que mis muestras serán almacenadas y podrán ser utilizadas en el futuro en la evaluación de nuevas estrategias que puedan servir para mejorar la detección temprana del cáncer de cuello del útero
- Que mi participación es voluntaria, no tendrá ningún costo y no me pagarán por participar
- Que puedo contactar a los médicos si tengo dudas o preguntas acerca del estudio
- Que me puedo retirar del estudio en cualquier momento o negarme a cualquier parte del estudio, incluyendo responder preguntas sobre mi historia personal y estilo de vida y proveer muestras adicionales a las recolectadas en esta primera visita, y que esto no representará ningún problema para mí

Sí, yo acepto participar

-Firma del paciente

Nombre completo Fecha...../...../.....

-Firma del administrador del consentimiento

Nombre completo..... Fecha...../...../.....

-Firma y nombre completo del testigo o familiar acompañante *(Para personas con dificultades de lectura/escritura)*

..... Fecha...../...../.....

9.3. Anexo 3: Listado de *primers* BSGP5+/6+^{Biot}.

<i>Primers no marcados</i>		
<i>Identificación</i>		<i>Secuencia nucleotídica [5' → 3']</i>
GP5+	F	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC
BSGP5+-2	F	TTT GTT ACT GTT GTI GAT ACT AC
BSGP5+-3	F	TTT GTT ACT GTT GTI GAT ACC AC
BSGP5+-4	F	TTT GTT ACT TGT GTI GAT ACT AC
BSGP5+-5	F	TTT TTA ACT GTT GTI GAT ACT AC
BSGP5+-6	F	TTT GTT ACT GTG GTA GAC ACT AC
BSGP5+-7	F	TTT GTT ACA GTI GTA GAC ACT AC
BSGP5+-8	F	TTT GTT ACA GTI GTA GAT ACC AC
BSGP5+-9	F	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACC AC
MS ₃ (β Globina)	F	AAT ATA TGT GTG CTT ATT TG
<i>Primers marcados con biotina en el extremo 5'</i>		
<i>Identificación</i>		<i>Secuencia nucleotídica [5' → 3']</i>
Bio-GP6+	R	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C
Bio-BSGP6+-b	R	GAA AAA TAA ATT GTA AAT CAT ACT AC
Bio-BSGP6+-c	R	GAA AAA TAA ATT GCA ATT CAT ATT C
Bio-MS ₁₀ (β Globina)	R	AGA TTA GGG AAA GTA TTA GA

9.4. Anexo 4: Listado de oligosondas tipo-especificas utilizadas para la genotipificación

<i>Identificación de la sonda</i>	<i>Secuencia nucleotídica [5'→ 3']</i>
P6 RLB	TCC GTA ACT ACA TCT TCCA
P11 RLB	TCT GTG TCT AAA TCT GCT AC
P16 RLB	CAT TAT GTG CTG CCA TAT C
P18 RLB	TGC TTC TAC ACA GTC TCC T
P26 RLB	GTA CAT TAT CTG CAG CAT C
P31 RLB	GCA ATT GCA AAC AGT GAT AC
P33 RLB	TGC ACA CAA GTA ACT AGT GA
P34 RLB	TTT TCA GTT TGT GTA GGT ACA
P35 RLB	CTG CTG TGT CTT CTA GTG A
P39 RLB	ATA GAG TCT TCC ATA CCT TC
P40 RLB	AGT CCC CCA CAC CAA CC
P42 RLB	TGG TGA TAC ATA TAC AGC TG
P43 RLB	TCT ACT GAC CCT ACT GTG
P44 RLB	TAC TAG TGA ACA ATA TAA GCA
P45 RLB	TAA TTT AAC ATT ATG TGC CTC
P51 RLB	TGC TGC GGT TTC CCC AA
P52 RLB	GAA TAC CTT CGT CAT GGC
P53 RLB	TGT CTA CAT ATA ATT CAA AGC
P54 RLB	CAC GCA GGA TAG CTT TAA T
P55 RLB	TCA GTC TCC ATC TAC AAC AT
P56 RLB	CAG AAC AGT TAA GTA AAT ATG
P57 RLB	CCA CAG AAA CTA ATT ATA AAG
P58 RLB	TAT GCA CTG AAG TAA CTA AG
P59 RLB	TCT ACT ACT GCT TCT ATT CC
P61 RLB	CCC CCC CTG TAT CTG AAT
P66 RLB	AGC TAA AAG CAC ATT AAC TAA
P68 RLB	CTG AAT CAG CTG TAC CAA T
P70 RLB	GAA ACG GCC ATA CCT GCT
P71 RLB	TGC TAC CAA AAC TGT TGA G
P72 RLB	AGC GTC CTC TGT ATC AGA A
P73 RLB	ACA GGC TAG TAG CTC TAC T
P81 RLB	GCT ACA TCT GCT GCT GC
P82 RLB	ACT GCT GTT ACT CAA TCT G

P83 RLB	TAC ACA GGC TAA TGA ATA CA
P84 RLB	TGC TAC CAA CAC CGA ATC A
P89 RLB	CTT CCC AGT CTG CCA CA
β Globina	CTT CTT TTA ATA TAC TTT TTT GTT
Cq	NNN NNN NNN NNN NNN NNN NN

9.5. Anexo 5: Guía rápida OncoE6™ Cervical Test

