Detección de ARNm de oncoproteínas E6/E7 del Virus del Papiloma Humano en cáncer de cuello uterino

>>> Cada año en nuestro país mueren 1.800 mujeres por Cáncer de Cuello Uterino el principal agente etiológico es el Virus del Papiloma Humano (VPH).En el siguiente trabajo se estudia la relación existente entre las proteínas E6 y E7 de VPH con el cáncer de cuello uterino, la detección de la sobreexpresión de ARN mensajero (ARNm) de los oncogenes E6 y E7 como un biomarcador para evaluar el riesgo de progresión de las lesiones de bajo y alto grado a cáncer de cuello uterino y una revisión de las técnicas aprobadas y utilizadas actualmente por la FDA (Food and Drug Administra-tion) para el diagnóstico de esta patología.

>>> AUTORES

Giselle di Filippo Iriarte[1], Julie Liliana Orjuela Vargas[2],William Frend Osorio Zambrano[3], LauraCarolinaJiménezCamargo[4]

Magíster en Microbiología clínica.

1 . Facultad Ciencias de la Salud, Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad de Boyacá, Colombia.
2 Bacterióloga, MSc Salud Pública. Facultad Ciencias de la Salud, Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad de Boyacá, Colombia.
3 Médico veterinario, MSc, Ph.D. Facultad Cien-cias e Ingeniería, Departamento de Química y Bioquímica de la Universidad de Boyacá, Colombia.
4 Estudiante, Facultad Ciencias de la Salud, Bacteriología y Laboratorio clínico de la Universidad de Boyacá, Colombia.

>>> CORRESPONDENCIA

Bact. Julie Liliana Orjuela Vargas

Carrera 2 este N°64-169
Muiscas, Tunja, BOYACÁ, Colombia
E-mail: jlorjuela@uniboyaca.edu.co

Publicado en Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana Incorporada al Chemical Abstract Service

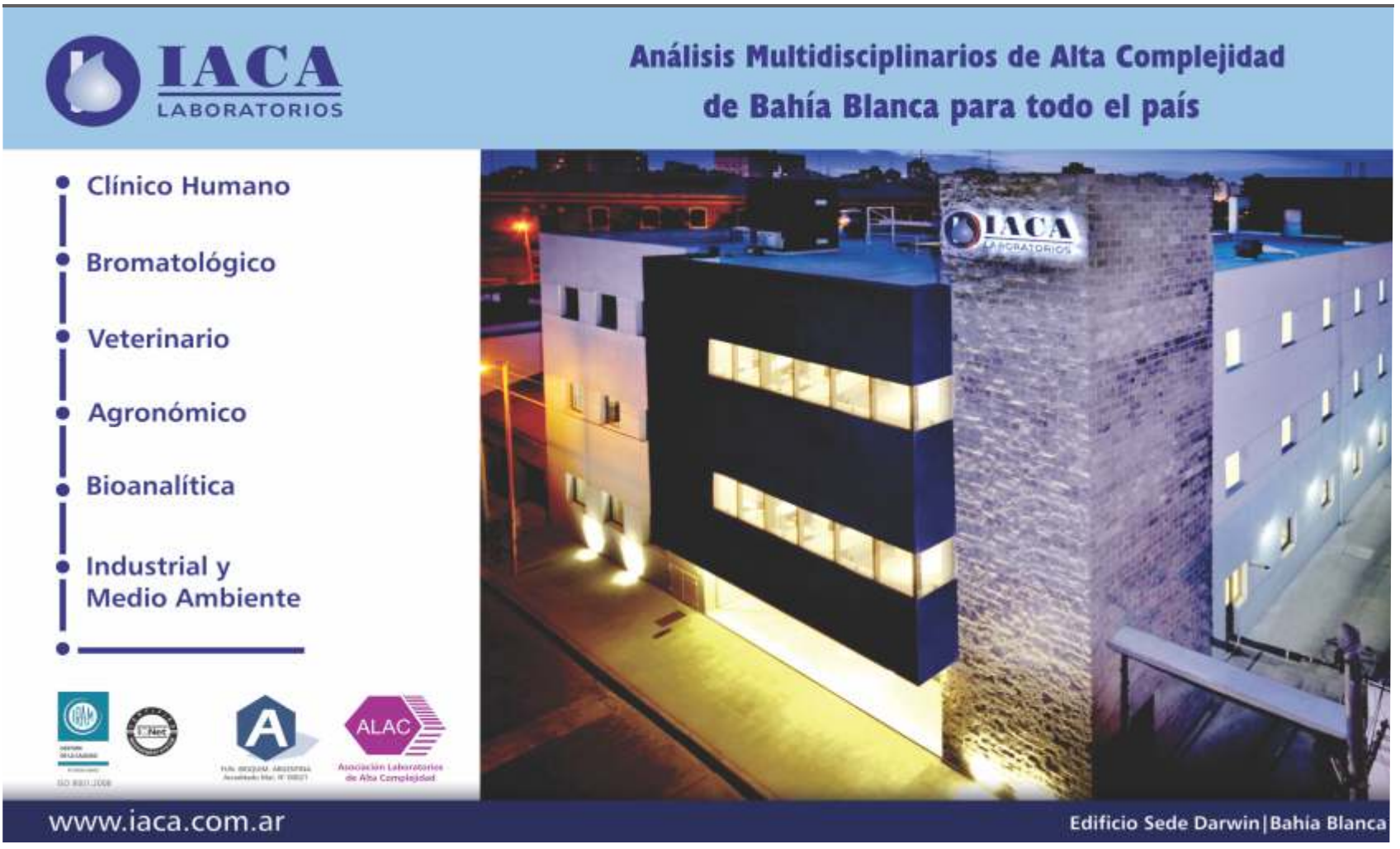
>>> RESUMEN

La infección de transmisión sexual por el Virus del Papiloma Humano (VPH) es una de las más comunes en el mundo. Los VPH se clasifican en bajo riesgo y alto riesgo. Los VPH de bajo riesgo son los causantes de lesiones benignas como verrugas genitales y condilomas acuminados, mientras que los VPH de alto riesgo pueden originar la transformación maligna de las cé-lulas del epitelio cervical por la acción de las oncoproteínas E6 y E7, lo que puede dar origen al cáncer de cuello uterino. La detección de los niveles de ARN mensajero (ARNm) de E6 y E7 de VPH en las células del epitelio cervical está siendo evaluada como un marcador predictivo del cáncer de cuello uterino como alternativa a las técnicas de detección del ADN de VPH. En este artículo se realizó una revisión crítica acerca de la relación existente entre la detección de la expresión de ARNm de E6 y E7 del virus del papiloma humano y el cáncer de cuello uterino. Además, se revisaron las técnicas aprobadas actualmente por la FDA (*Food and Drug Administration*) para la detección de ARNm de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH y el estado del arte del VPH en Colombia.

Palabras clave: virus del papiloma humano * oncoproteínas * cáncer de cuello uterino * citología cervical.

>>> INTRODUCCIÓN

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es el



causante de una de las infecciones de transmisión sexual más pre-valentes alrededor del mundo. Se estima que alrededor de 600 millones de mujeres y hombres están infectados mundialmente con VPH (1). Existen más de 200 genotipos de papilomavirus humano que están distantemente relacionados (2) (3). Los seres humanos en su gran mayoría son colonizados simultáneamente por varios VPH a nivel de piel y mucosas sin presentar sintomatología, por tanto se considera que estos virus son parte de la microbiota de la piel sana de los humanos (4). La mayoría de los VPH pertenece a los géneros alfa y beta, mientras que unos pocos subtipos pertenecen a los géneros gamma, mu y nu (2). Comúnmente, los VPH alfa infectan las mucosas mientras que los VPH beta infectan el epitelio cutáneo externo (2). Los VPH se dividen en tres grupos principales: cutáneo, mucocutáneo y los asociados con la epidermodisplasia verruciforme (un raro trastorno autosómico recesivo). Los VPH cutáneos forman parte del género beta y algunos corresponden a los géneros gamma, mu y nu, mientras que los VPH de mucosas y algunos tipos cutáneos pertenecen al género alfa (2). Otra forma de agrupar los VPH es de acuerdo a las áreas de infección afectadas: epitelio cutáneo externo, región anogenital y región oral. Los VPH de tipo mucocutáneo se pueden subdividir en los de bajo riesgo oncogénico (asociados principalmente con verrugas benignas) y los VPH de alto riesgo oncogénico (5). El mecanismo oncogénico por medio del cual el VPH causa la transformación de las células es la síntesis de las oncoproteínas E6 y E7, cuya función es inactivar o propiciar la degradación de las proteínas supresoras de tumores como p53 y Retinoblastoma (Rb) (6). Teniendo en cuenta la relación existente entre las proteínas E6 y E7 de VPH y su relación con el cáncer de cuello uterino, la detección de la sobreexpresión de ARN mensajero (ARNm) de los oncogenes E6 y E7 de VPH en células del epitelio cervical podría utilizarse como un biomarcador para evaluar el riesgo de progresión de las lesiones de bajo y alto grado a cáncer de cuello uterino (7–9). Actualmente se están evaluando técnicas que detectan los transcritos de las oncoproteínas E6/E7 de VPH, las cuales han demostrado una especificidad más alta que las técnicas utilizadas para detectar el ADN de VPH en los casos de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) II y III y cáncer de cuello uterino (10), aunque es necesario indicar que faltan más estudios que evalúen la eficacia de estas nuevas técnicas en términos de estratificación del riesgo de cáncer (11–14).

En este artículo se hace una revisión en el contexto de la infección con VPH y el riesgo de desarrollo de cáncer de cuello uterino. Para realizar esta revisión el artículo se centrará en cinco temas: las generalidades del virus del papiloma humano, la función de las oncoproteínas VPH (E6 y E7) en el desarrollo del cáncer, la epidemiología a nivel mundial y de Colombia del cáncer de cuello uterino, y finalmente, las técnicas modernas de detección de los niveles de ARNm de los VPH de alto riesgo.

Generalidades del virus del papiloma humano

El virus del papiloma humano pertenece a la familia *Papoviridae*. Las partículas virales de VPH presentan una cápside icosaédrica sin envoltura (50-60 nm de diámetro) conformada por 72 capsómeros. El genoma de los VPH es del tipo de ADN circular bicatenario (aproximadamente 8 kb) que contienen ocho o nueve marcos abiertos de lectura (ORF) con un genoma organizado en tres regiones básicas: una región reguladora (LCR –con sitios de unión de factores de transcripción y control de la expresión génica), una región temprana (E– codifica seis genes, E1, E2, E4, E5, E6 y E7, implicados en funciones como la replicación viral y la transformación celular) y una región tardía (L - codifica las proteínas de la cápside L1 y L2) (4) (15) (16) (Figura 1). E1 codifica una ADN helicasa necesaria para la replicación y amplificación del genoma vírico. E2 tiene funciones en la transcripción viral, replicación y partición del genoma (puede unirse a sitios en el genoma vírico y celular). Las funciones de E2 dependen de su interacción con

>

PORQUE UN DIAGNÓSTICO PRECISO
NECESITA RESULTADOS CONFIABLES.

Nuestro laboratorio integral está al servicio del profesional, brindando resultados confiables y asesoramiento en su interpretación, facilitando información precisa para colaborar en el diagnóstico, seguimiento y prevención de las enfermedades.

Nuestro compromiso: brindar un servicio personalizado a través de un equipo de especialistas, cumplir con los más exigentes estándares de calidad, y garantizar confiabilidad y exactitud en los resultados.

/ Biología Molecular
/ Citometría de Flujo
/ Hematología y Hemostasia
/ Inmunoserología
/ Microbiología
/ Química Clínica
/ Endocrinología
/ Virología

OAA
Consultar alcance en www.oaa.org.ar

sysmex

RIQAS

PROGBA CEMIC

cap

STAMBOULIAN LABORATORIO

PLANTA DE LABORATORIO
Av. Scalabrini Ortiz 676

DPTO. COMERCIAL
4858-7061 al 63
laboratorio@stamboulian.com.ar

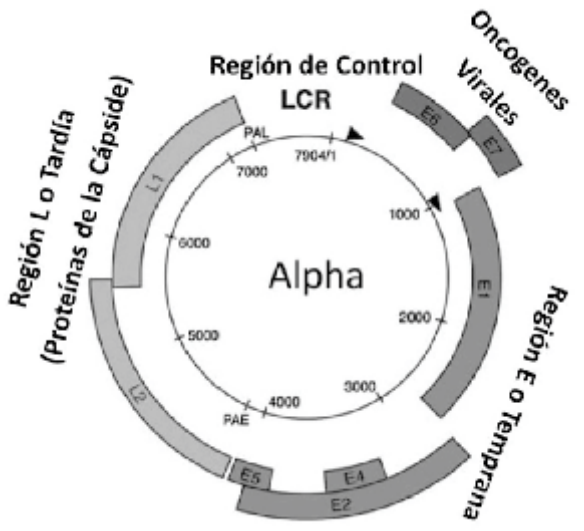
Centro de Atención Telefónica
2206-6000

www.stamboulian.com.ar

STAMBOULIAN
SERVICIOS DE SALUD

los productos génicos celulares y de las condiciones que sean necesarias para beneficiar el virus. E2 puede regular transcripcionalmente E6 y E7 jugando un papelcrítico en la conducción de la entrada al ciclo celular permitiendo la amplificación del genoma viral en las capas medias del epitelio e inhibiendo algunos aspectos de la inmunidad innata (15). Las infecciones por el virus de papiloma humano en la mucosa del cuello uterino se han estudiado ampliamente, detectándose una infección asintomática en 11-12% de todas las mujeres. La incidencia de VPH asintomático es mayor en mujeres y hombres jóvenes (50-80%) disminuyendo en grupos de mayor edad. Las infecciones inaparentes y enfermedades de bajo grado presentan típicamente múltiples tipos de VPH, entre los que se incluyen VPH 16 (3,2%), 18 (1,4%), 31 (0,8%) y 58 (0,7%). La detección del VPH aumenta con la gravedad de la enfermedad presentando un porcentaje de positividad del 50-70% en NIC I, del 85% en NIC II y del 90-100% en NIC III(17) (18).

>> Figura 1. Estructura del genoma del Virus del Papiloma Humano alfa. Región E temprana que contiene los genes E1, E2, E4, E5 y los oncogenes E6 y E7 causantes de la transformación maligna de la célula infectada. E1 y E2 mantienen bajos los niveles de expresión de E6 y E7. La integración al genoma de la célula infectada ocurre en las regiones E1 y E2, produciéndose sobre expresión de los oncogenes virales. (Modificada de Doorbar J et al. 2015) (15).



Los VPH están clasificados de acuerdo a su potencial para inducir el proceso de carcinogénesis, en VPH de bajo riesgo y VPH de alto riesgo. Los VPH de bajo riesgo se encuentran causando lesiones verrugosas benignas, predominantemente condilomas acuminados y papilomatosis laríngea (6, 11, 26, 34, 40, 42, 43,44, 53, 54, 55,57, 61, 62, 64, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 83, 84, 89). Los más prevalentes de este grupo son los genotipos 6 y 11. Los VPH de alto riesgo son oncogénicos y son los responsables del 70% de todos los casos de cáncer de cuello uterino. A este grupo pertenecen los genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 sien-do VPH 16 y VPH 18 los más prevalentes causando cáncer de cuello uterino (19). Las proteínas E6 y E7 son consideradas las principales conductoras oncogénicas codificadas por VPH (20) (21). A continuación, se presenta una revisión de cómo las oncoproteínas E6 y E7 inducen a la inestabilidad genética en las células infectadas y su subsecuente transformación maligna.

Función de las oncoproteínas E6 y E7 en el desarrollo de lesiones premalignas y malignas del cáncer de cuello uterino

El ciclo de VPH está ligado a la diferenciación de los queratinocitos en piel y mucosas. Una vez que el virus logra penetrar a la célula hospedadora inicia la expresión de sus genes en las capas superficiales del estrato espinoso y epitelio granuloso donde expresan grandes cantidades de proteínas virales y ocurre el ensamblaje viral (22). El VPH puede encontrarse en el tejido cervical en forma de episomas o integrado a la célula hospedadora. Las células con el virus integrado adquieren ventajas de crecimiento, lo que les permite una expansión clonal con una consecuente inestabilidad genética que puede conducir a un proceso de malignización. Los VPH de alto riesgo como 16 y 18 tienen la capacidad de integrar su genoma al de la célula hospedadora y por esta razón son considerados altamente oncogénicos (19). Idealmente, las proteínas E1 y E2 son las encargadas de mantener bajos los niveles de expresión de los genes

E6 y E7 pero la síntesis de las proteínas E1 y E2 se ve frecuentemente afectada debido a que la integración del genoma viral en la célula hospedadora en la región de los genes E1 y E2 interfiere con su función (23) (24). La pérdida de la expresión de la proteína E2 permite la sobreexpresión de los genes E6 y E7 y una síntesis constante de estas dos importantes oncoproteínas virales de VPH (22) (25) (26).

Las oncoproteínas E6 y E7 se expresan conjuntamente en el curso de la infección por VPH y en el subsecuente desarrollo de cáncer y por tanto es importante diferenciar su contribución individual. E7 suprime la ruta del Rb para promover la transformación celular. En adición, las oncoproteínas E6 en VPH tienen otras múltiples funciones importantes para la transformación celular tales como la degradación de p53 (Figura 2), la disminución de la expresión de p21 y un aumento de la Telomerasa Transcriptasa Inversa (TERT). Los virus VPH de bajo o alto riesgo favorecen su propagación propiciando la degradación de p53 a través de una ubiquitinación asociada a la ubiquitina ligasa proteína asociada a E6 (E6-AP), lo que conlleva a una atenuación de la respuesta al daño del ADN y la apoptosis.

Igualmente, la disminución de la expresión de p21 (un inhibidor de los complejos ciclina/quinasa dependiente de ciclina en G1, *Gap* 1) observada en los VPH E6 propicia el paso a la fase celular de síntesis (S) en células con daño del ADN favoreciendo la inestabilidad genética. Un incremento de la expresión de TERT en los VPH E6 de alto riesgo conduce a la activación de la telomerasa y la elongación de los telómeros permitiendo la inmortalización de las células infectadas (27). La oncoproteína E7 interfiere con la señalización de Rb para permitir el tránsito de las células de G1 a S. La unión de la región C-terminal

MicroScan

BECKMAN COULTER

Microbiologia Automatizada

Identificación y Sensibilidad

Microscan responde a las necesidades de atención eficaz de los pacientes mediante resultados automatizados rápidos de ID/AST sin reducir la exactitud.

Selección de colonias con PROMPT

Estandarización de inóculos sin pérdida de tiempo por turbidez gracias al sistema de inoculación PROMPT™

Preparación de inóculos con PROMPT

La estabilidad del inóculo de hasta cuatro horas flexibiliza el flujo de trabajo.

Inoculación de panel con RENOK

La inoculación simultánea de los 96 pocillos del panel simplifica el flujo de trabajo.

Sistemas MicroScan

La línea se completa con múltiples opciones de paneles que han sido adaptados a la epidemiología local, de tipo Combo (ID/AST), solo CIM y solo identificación. También Paneles para identificación de levaduras, anaerobios y fastidiosos y Paneles especiales para sensibilidad de Microorganismos exigentes.

LabPro Software Suite

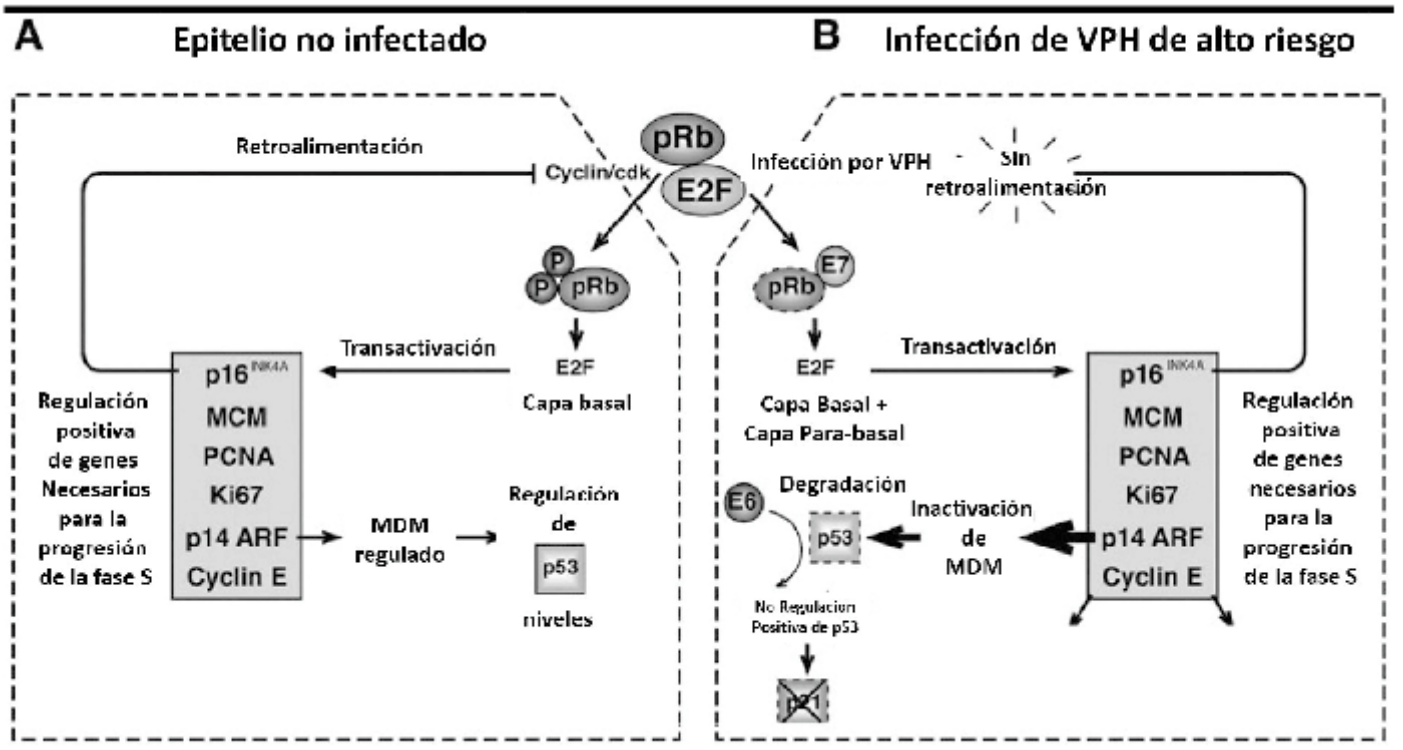
La mejora de la gestión de datos con el conjunto de aplicaciones de LabPro promueve la eficacia en el laboratorio al agilizar el flujo de trabajo y facilitar el acceso a la información del paciente. LabPro Manager, LabPro Alert y LabPro Connect en forma conjunta, le ayudan a estandarizar y consolidar los pruebas, adoptar la creación versátil de informes de resultados y aumentar su capacidad para identificar la emergencia de nuevas resistencias.

BIODIAGNOSTICO

Av. Ing. Huergo 1437 P.B. "I" C1107APB - Buenos Aires Argentina **Tel./Fax: +5411 4300-9090**

info@biodiagnostico.com.ar www.biodiagnostico.com.ar

>> Figura 2. La infección por Virus del Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo altera las vías moleculares que regulan la proliferación celular y la diferenciación epitelial. El desarrollo del ciclo celular está regulado en las capas epiteliales por los miembros de la familia de proteínas pRb (retinoblastoma). Las oncoproteínas E7 de los VPH de alto riesgo son dirigidas a estas proteínas para generar su degradación (como se muestra en B). La incapacidad de los VPH de bajo riesgo para impulsar una proliferación de células basales es debida a que estos solo pueden atacar de manera eficiente a la familia del retinoblastoma p130. Las oncoproteínas E7 se dirigen a todos los miembros de pRb. Además de esto los VPH de alto riesgo codifican una segunda proteína llamada E6 que actúa suprimiendo el aumento de p53. Las oncoproteínas E6 de alto riesgo regulan los niveles de p53 en la célula por medio de su ubiquitinación y degradación a través de la ruta del proteosoma. En células no infectadas (mostradas en A), los niveles de p53 se mantienen en un nivel bajo (Modificada de Doorbar J et al, 2015) (15).



de E7 a la proteína Rb provoca la liberación del factor de transcripción E2F involucrado en la expresión de genes requeridos para entrar en fase de síntesis. Una mayor afinidad a Rb se observa en los VPH de alto riesgo, ya que sus oncoproteínas E7 tienen la capacidad de unirse a los tres miembros de la familia Rb (pRb, p107 y p130) para su degradación. El resultado de la disrupción de los diferentes complejos de la familia Rb-E2F elimina la represión de genes que responden a E2F (tales como ciclina A y E, ADN polimerasa α y PCNA [*Proliferating Cell Nuclear Antigen*]) conduciendo las células a la síntesis de ADN. Las oncoproteínas E7 en conjunto con las oncoproteínas E6 también afectan la función de la proteína supresora de tumores p53, al inhibir su acetilación (interrumpiendo su capacidad de activación transcripcional) (27).

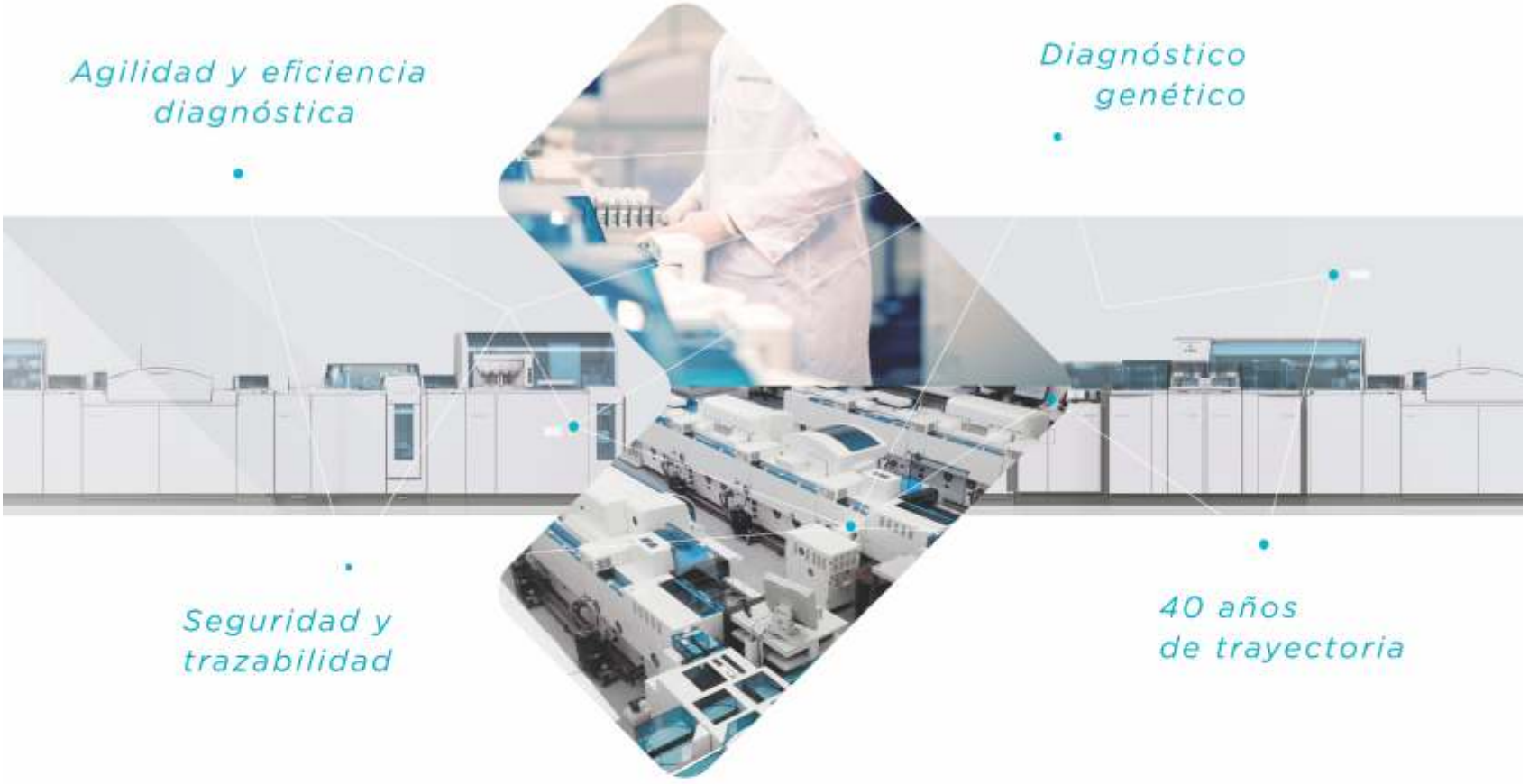
Las múltiples acciones epigenéticas que generan las oncoproteínas E6 y E7 permiten una infección persistente que produce una inestabilidad genética con una consecuente transformación celular que finalmente puede terminar en el desarrollo de cáncer (25) (28–30).

Epidemiología mundial y nacional del cáncer de cuello

- NUEVA PLANTA AUTOMATIZADA -

Agilidad y eficiencia diagnóstica

Diagnóstico genético



Seguridad y trazabilidad

40 años de trayectoria

AVANZAMOS

Con esfuerzo, inversión permanente en tecnología y profesionales con los más altos valores humanos inauguramos nuestra nueva planta automatizada con metodología Lean en sus procesos.

Un laboratorio de vanguardia al servicio de la salud.

Labmedicina

ANÁLISIS CLÍNICOS

OAA

CALIDAD ACREDITADA **ISO 15189**
Alcances en www.oaa.org.ar

www.labmedicina.com

uterino

El cáncer cervical es el cuarto cáncer más común en mujeres y se estima que en 2012 hubo 528.000 nuevos casos y 266.000 muertes por este tipo de cáncer, represen-tando el 7,5% de todas las muertes en el sexo femenino. Según datos de la IARC (*International Agency for Research on Cancer*), el 85% de la carga mundial de esta enfer-medad ocurre en regiones menos desarrolladas como África Oriental y Central donde sigue siendo el cáncer más común en mujeres con una tasa de mortalidad de 22,2 y 27,6 por cada 100.000 mujeres, respectivamente(32) (Figura 3) (Figura 4). En Colombia el cáncer de cuello uterino es la segunda causa de mortalidad por cáncer entre la población femenina después del cáncer de mama. Según datos del Instituto Nacional de Cance-rología (INC), en 2011 se presentaron 1.744 muertes, siendo Bogotá y los departamentos de Antioquia y Valle del Cauca las áreas que reportaron el mayor número de muertes. En Boyacá, durante el periodo de 2006 a 2011 se presentaron 131 casos anuales de cáncer de cuello uterino y se reportaron 244 muertes por esta causa durante el periodo de 2007 a 2011 (33). A nivel nacional el cáncer de cuello uterino es de gran importancia al afectar a un gran número de mujeres. El cáncer de cuello uterino puede detectarse tempranamente a través de programas de tamizaje y esto, combinado con un acceso al tratamiento oportuno podría disminuir la incidencia y la mortalidad de este tipo de cáncer al menos a los niveles observados en países más desarrollados. En Bu-caramanga, Manizales y Cali se han reportado tasas de incidencia aproxima-damente de 20 por 100.000 y Pasto, 27 por 100.000. El

>> Figura 3. Tasas estimadas por edad a nivel mundial de casos incidentes, cáncer de cuello uterino, en todo el mundo en 2012. En Colombia se presentó una incidencia de 18.7 casos en el año de 2012 por cáncer de cuello uterino. En América latina, los países que más incidencia presentan de cáncer de cuello uterino son México, Nicaragua, Venezuela, Perú, Bolivia y Paraguay, así mismo los países del continente africano (Modificada de Cancer IARC. GLOBOCAN. 2012) (32).

Registro poblacional de cáncer de Cali ha reportado un descenso progresivo en las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer de cérvix durante los últimos 40 años.

Las razones por las que se ha generado un descenso de las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer de cérvix son múltiples, entre las cuales se considera una mejoría en las condiciones socio-económicas, un descenso en las tasas de fecundidad y algún efecto de los programas de tamizaje (34).

La citología es la prueba de cribado de elección para la detección presuntiva de lesiones precancerosas de cáncer de cérvix. La sensibilidad de esta prueba puede variar entre 50% y 98% dependiendo de la toma de una muestra representativa. Una muestra satisfactoria debe incluir las zonas exo y endo-cervical (zonas escamocolumnar y de transformación), y de acuerdo con el sistema Bethesda, en dicho extendido se deben poder observar células metaplásicas y/o endocervicales (35). Las técnicas moleculares de detección de tipos virales de VPH de alto riesgo tienen un bajo valor predictivo positivo al no poder mostrar la progresión de la enfermedad. Por tanto, la utilidad de estos métodos moleculares en el cribado de las pacientes permite establecer el grupo de riesgo (al ser portadoras o no de VPH de alto riesgo). Una vez detectada la presencia de VPH de alto riesgo, el control posterior requiere de la colposcopía y de la citología. El método predictivo para detectar cambios precoces en la transformación celular sigue siendo la citología, debido a que se puede observar la presencia de los koilocitos en los estados tempranos de la infección viral (36). A continuación, se discuten diferentes técnicas que miden los niveles de expresión de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH.(31)

Técnicas que detectan ARNm de oncoproteínas E6/E7 de VPH y su importancia en la detección temprana de lesiones de bajo grado y alto grado de cáncer de cuello uterino

Se ha establecido que la sobreexpresión de los ge-nes E6 y E7 es importante en los procesos de transformación maligna de células infectadas y el subsecuente desarrollo de cáncer (37). Al ser los niveles del ARN mensajero de los genes E6 y E7 de VPH un indicador del nivel de síntesis de las oncoproteínas E6 y E7 se han desarrollado técnicas que detectan dichos niveles, lo que permite predecir el riesgo de las pacientes de pade-cer cáncer de cuello uterino. En la actualidad se conocen tres (3) pruebas diagnósticas aprobadas por la FDA en la detección de

Fast Track DIAGNOSTICS
A Siemens Healthineers Company

ZIKA, DENGUE & CHIKUNGUNYA

KIT DE DETECCIÓN POR REAL TIME PCR DISEÑADO PARA LA DETECCIÓN Y DIFERENCIACIÓN ESPECÍFICA DE LOS VIRUS ZIKA, DENGUE Y CHIKUNGUNYA EN MUESTRAS CLÍNICAS PROCEDENTES DE PACIENTES CON SIGNOS Y SÍNTOMAS DE INFECCIÓN POR ESTOS VIRUS

- El RNA es extraído a partir de las muestras clínicas, provenientes de sangre entera, suero, plasma u orina
- Compatible con múltiples plataformas de extracción manual y automáticas
- FTD-84-32 Test para 32 reacciones
- FTD-84-64 Test para 64 reacciones
- Validados con diferentes equipos de Real Time PCR

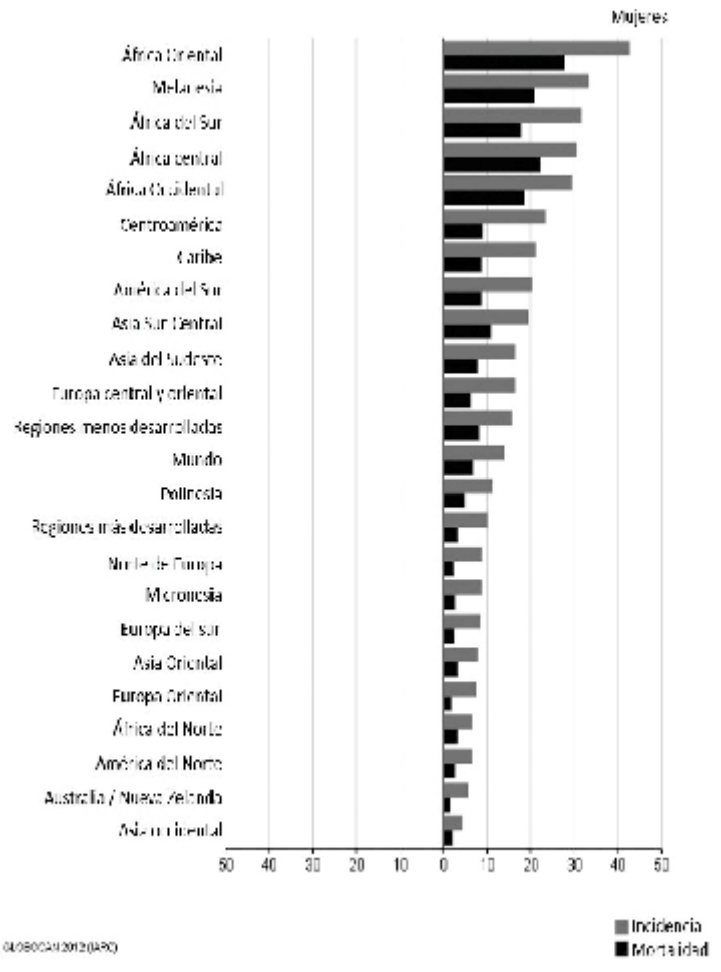
tecnolab

ISO 9001:2015 Management System
TÜVRheinland CERTIFIED
www.tuv.com ID 9105021490

Estomba 964 | C1427COV CABA
Buenos Aires | Argentina
Tel: 54 11 4859 5300
info@tecnolab.com.ar
tecnolab.com.ar

ARNm de las oncoproteínas E6 y E7: PreTect HPV-Proofer, NucliSENS Easy Q HPV y APTI-MA HPV (38) (Tabla 1). A continuación, se presenta una breve descripción de las tres pruebas mencionadas anteriormente.

>> Figura 4. Tasas de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad estimadas en el mundo por 100.000 habitantes. Casi 9 de cada 10 muertes por cáncer de cuello uterino (87%) ocurren en las regiones menos desarrolladas. Las regiones de alto riesgo, con tasas de incidencia estimadas por edad de 2012 de más de 30 casos por 100.000 mujeres, incluyen África Oriental (42,7 casos), Melanesia (33,3 casos), África Meridional (31,5 casos) y África Central (30,6 casos). Las tasas de incidencia son más bajas en Australia/Nueva Zelanda (5,5 casos) y Asia occidental (4,4 casos) (Modificada de Cancer IARC. GLOBOCAN. 2012) (32).



Pretect HPV-Proofer (Norchip AS, Klokkarstua, Norway)

Esta prueba diagnóstica consiste en un proceso de amplificación enzimática en tiempo real que puede amplificar y detectar ARN (NASBA [*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*]) incluso en presencia de ADN. Es un método de amplificación isotérmico de ARN en donde se realiza la detección de ARNm de oncoproteínas E6 y E7 de 5 tipos de VPH de alto riesgo que son considerados carcinogénicos (16, 18, 31, 33 y 45). El método denominado NASBA consiste en la extensión de un cebador y transcripción mediante la participación de tres enzimas: Ribonucleasa (RNAsa) H, transcriptasa inversa y ARN polimerasa. La reacción al ser isotérmica (41 °C) no necesita termociclador. Esta prueba es utilizada para detectar la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 en células infectadas con los cinco tipos de VPH de alto riesgo que están asociados con carcinomas de células escamosas cervicales y adenocarcinomas (39–42).

Nuclisens Easy Q HPV (bioMérieux)

Esta prueba se basa en los mismos principios de la anterior, pero se diferencia en que utilizan diferentes protocolos de extracción de ARNm y métodos de análisis de datos. Esta técnica detecta la expresión de los factores oncológicos E6 y E7 VPH de los cinco genotipos de alto riesgo (16, 18, 31, 33 y 45). Esta técnica es utilizada en la detección de ARNm de E6 y E7 en mues-tras cervicales de Células Escamosas Atípicas de Significado No Determinado (ASC-US [*Atypical Squamus Cells of Undetermined Significance*]), Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Bajo Grado (LIEBG) y Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Alto Grado (LIEAG). Ha demostrado una técnica de gran sensibilidad y especificidad en la detección de los tipos de VPH de alto grado más oncogénicos en pacientes con NIC2+ al ser comparada con la técnica de Captura Híbrida 2 (CH2) que detecta ADN del virus. Estudios comparativos de las dos técnicas mostraron que la técnica de

detección de ARNm es más especifica que la de ADN, debido a que CH2 solo muestra el genotipo VPH oncogénico y no la presencia de los transcritos de E6 y E7, que son los que realmente indican el riesgo de progresión a cáncer en los pacientes (43–45).

APTIMA HPV

El ensayo de Aptima HPV es una técnica de captura de híbridos (CH2). Es el método utilizado con mayor frecuencia en la detección de ADN-VPH, con posterior amplificación mediada por transcripción y protección de hibridación de sonda para la detección de expresión de ARNm de E6 y E7. Esta prueba diagnóstica tiene la ventaja que detecta cualitativamente ARNm de las oncoproteínas E6 y E7 de 14 tipos de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68). La prueba se realiza en tres etapas básicas en un solo tubo: captura de la diana, amplificación de la diana por transcripción y detección de la amplificación de productos.

La amplificación de diana por transcripción implica dos enzimas, transcriptasa inversa y ARN polimerasa. La transcriptasa inversa genera una copia de ADN Com-plementario (ADNc) de la secuencia de ARNm diana que contiene una secuencia promotora de ARN polimerasa, donde la ARN polimerasa produce múltiples copias de ARN de amplicones comparado con el ADN de muestra. Para la detección rápida de los amplicones se usa un ensayo de protección de hibridación, donde sondas de ácido nucleico de cadena sencilla (complementarios a los amplicones diana) poseen marcadores quimio-luminiscentes que pueden diferenciar entre son-das hibridas y no hibridas (se inactiva el marcador). La luz emitida por los híbridos de ARN/ADN marcados se mide con señales de fotones en un luminómetro y se

BD Vacutainer®
Líder en Soluciones Preanalíticas

Calidad y Bioseguridad:
Su interés y nuestro compromiso

Para contactarse, llámenos al: 0800-444-55BD (23)
o escríbanos a: vacutainer@bd.com

informan como unidades de luz relativa (38) (46) (47).

Pruebas realizadas con el *kit* de Aptima han demostrado que puede utilizarse para muestreo cervical y vaginal en la detección de VPH de alto riesgo (48) (49). La técnica Aptima para la detección de VPH de alto riesgo es una prueba diagnóstica complementaria del Papanicolau que es aprobada por la FDA para su uso en mujeres mayores de 21 años con muestras del Papanicolau que reportan células escamosas atípicas con significado in-determinado. La prueba Aptima cumple los criterios de equivalencia clínica basados en la exactitud transversal relativa de pruebas de ADN de VPH. El ensayo de Aptima VPH, en un escenario transversal, es clínicamente comparable a GP5 + / GP6 + PCR (*Polymerase Chain Reaction*) y cumple con los criterios transversales de sensibilidad clínica y especificidad para NIC2 + (50) (51).

>> Tabla 1. Técnicas que detectan ARNm de E6/E7 de VPH (43) (45) (46).

Técnica	Fundamento
PreTect HPV-Proofer, NucliSENS Easy Q HPV	Son dos variantes comerciales del mismo ensayo basado en la tecnología NASBA, que involucra una reacción de PCR en tiempo real isotérmica. La prueba permite la detección de los transcriptos ARNm correspondientes a las oncoproteínas virales E6 y E7 de los 5 tipos de VPH-AR más frecuentes en cáncer cervical a nivel mundial: VPH 16, 18, 31, 33 y 45.
APTIMA HPV	Permite la detección de ARNm de los 12 tipos de VPH-AR según IARC-2009, más VPH 66 y 68, pero no discrimina entre los 14 tipos. La técnica involucra tres pasos principales que tienen lugar en un único tubo: captura de las secuencias blanco, amplificación génica mediada por trascripción (TMA) y la detección de los productos amplificados a través de un proceso de hibridación y quimioluminiscencia en tiempo real.

Estado del arte de VPH en Colombia

El virus del papiloma humano es una de las causas más frecuentes del cáncer de cuello uterino en Colombia y aunque es un factor etiopatológico necesario no es suficiente para el desarrollo de la carcinogénesis cervical. La prevalencia de esta infección viral es homogénea a nivel mundial, aunque se observa una prevalencia tipo-específica según la región geográfica. En Colombia se han descrito algunos problemas para la imple-mentación del tamizaje en la detección de VPH tales como la asociación de la infección por VPH con una enfermedad venérea, la ausencia de un adecuado registro de diagnóstico definitivo en lesiones preneoplásicas, la falta de lectura adecuada de las citologías y la no estandarización de la técnica de colposcopia. También se presentan problemas de entrenamiento a los profesionales de la salud que frecuentemente sobreestiman la sensibilidad de las pruebas citologías. Además de lo expresado anteriormente, los problemas institucionales no permiten un acceso fácil a la población femenina en general a las citologías, colposcopias y biopsias de estas lesiones preneoplásicas (52).

ESTUDIOS DE ANÁLISIS MOLECULAR DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO REALIZADOS EN COLOMBIA

En Bogotá (Colombia) se realizó un estudio en 2003 donde se analizaron 230 muestras de cepillados cervicales en mujeres entre 18 y 36 años con citología normal mediante PCR GP5+/GP6+, utilizando la técnica SSCP y secuenciación directa para realizar la tipificación de VPH (48) (53) (54). Se encontró una prevalencia de la infección por VPH de 18,2%, detectándose 15 tipos de VPH. Dentro de los VPH detectados cuatro tipos no se pudieron tipificar por mé-todos convencionales de hibridación. Los cinco tipos más prevalentes detectados fueron el VPH16, VPH31, candidato VPH90, VPH59 y VPH18.

La secuenciación directa de ADN permitió

>

ELITechGroup
MOLECULAR DIAGNOSTICS

ELITe InGenius
PCR Real Time
Totalmente Automatizado

Patógenos de trasplante
- CMV
- EBV
- BKV
- VZV
- HSV1
- HSV2
- Parvovirus B19
- Adenovirus
- Enterovirus
- JCV
- HHV6
- HHV7
- HHV8
- Toxoplasma gondii
- Hepatitis E (RUO)
- WNV
- Aspergillus

Onco-Hematológicas
- Coagulation factors panel
  - Factor V
  - Factor II
  - MTHFR

Infecciones Resistencia a Antibióticos
- MRSA/SA
  - S. aureus
  - mecA/mecC
- C. difficile
  - Toxin A
  - Toxin B
- CRE 21
  - KPC
  - IMP, VIM, NDM
  - OXA
- ESBL
  - CTX-M-1,15
  - CTX-M-9,14
- Colistin Resistance
  - mcr1
  - mcr2

Meningitis
- Viral panel 1
  - HSV1
  - HSV2
  - VZV
- Viral panel 2
  - Enterovirus
  - Parechovirus
  - Adenovirus
- Bacterial panel
  - N. meningitidis
  - S. pneumoniae
  - H. influenzae

Enfermedades de transmisión sexual
- MG + Resistance
  - M. genitalium
  - Macrolide resistance
- STI PLUS Panel
  - C. trachomatis
  - N. gonorrhoeae
  - M. genitalium
  - T. vaginalis
- C. trachomatis

Infecciones Respiratorias
- Viral panel
  - Flu A
  - Flu B
  - RSV
- Bacterial panel
  - C. pneumoniae
  - M. pneumoniae
  - Legionella pn.
- MTB + Resistance
  - MTB complex
  - Rifampicin resistance
  - Isoniazid resistance

Gastro-Intestinal Infection
- Norovirus
  - Genotypes I & II
- Viral Panel
  - Rotavirus
  - Adenovirus
  - Astrovirus
- Bacterial panel
  - Campylobacter spp.
  - Salmonella spp.
  - Y. enterocolitica
- Parasitic panel
  - G. lamblia
  - C. parvum
  - E. histolytica

BIODIAGNOSTICO

+54 11 4300 9090 | info@biodiagnostico.com.ar | www.biodiagnostico.com.ar

identificar tipos de VPH que no habían podido ser tipificados con otros métodos. El proceso de carcinogénesis cervical presenta múltiples componentes, entre los que se cuentan los genéticos, los epigenéticos y los medios ambientales. Se han realizado múltiples estudios encaminados a establecer marcadores moleculares como mutaciones en oncogenes, oncoproteínas y genes supresores de tumores que estén asociados con la progresión de la infección o la enfermedad. Los genes candidatos más estudiados en cáncer cervical en distintas poblaciones han sido *H-RAS, K-RAS, EGFR*. Según un estudio de tipo descriptivo realizado en Bogotá (Colombia) en el año 2009 se obtuvieron muestras por cepillado cervical y sangre periférica al momento de la colposcopia a mujeres con un diagnóstico citológico de lesión intraepitelial de alto grado. Se detectó el VPH genérico mediante PCR con los iniciadores GP5+/GP6+, y específico para VPH 16 y 18 en la región E6/E7. Para detectar las muta-ciones en el codón 12 de *H-RAS*, codones 12 y 13 de *K-RAS* y el exón 21 de *EGFR* se realizó una secuenciación directa de los productos de PCR de estos fragmentos génicos. Todos los ADNs obtenidos evidenciaron una bue-na calidad, medida con la amplificación mediante PCR del gen b-globina, además, se observó que el proceso de restauración mejora la calidad del ADN del plasma, aumentando la sensibilidad de la amplificación de este gen. En este estudio se obtuvo una buena correlación entre las muestras de plasma sanguíneo y los cepillados cervicales tanto para los hallazgos de VPH como para las mutaciones que se evaluaron. Además, no se encontraron mutaciones en *EGFR* en el exón 21, en el codón 12 y 13 en *K-RAS* y en el codón 12 en *H-RAS*. Por esta razón, el análisis de mutaciones y de la presencia de marcadores tumorales en plasma puede ser relevante cuando no se dispone de otras muestras como el cepillado cervical (50) (55) (56). En un estudio prospectivo de casos y controles en el departamento del Cauca (Colombia) realizado durante enero de 2002 y diciembre de 2003 en 98 mujeres, fue determinado el ADN de VPH por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, donde se logró analizar y observar los factores de riesgo asociados a una neoplasia cervical. El ADN genómico fue extraído de células cervicales exfoliadas utili-zando la técnica por Chelex (SIGMA, No. C7901). Para la detección de VPH se utilizó una técnica previamente estandarizada y utilizada por el grupo de investigación. La amplificación de bandas a 670 o 420 pb indicó la presencia de VPH de bajo o alto riesgo, respectivamente. Todas las reacciones incluyeron controles internos de amplificación utilizando cebadores específicos para β-globina. En este estudio se obtuvo que el 91% de las pacientes evaluadas fueron positivas para el VPH y que la multiparidad y la exposición a carcinógenos como monóxido de carbono, óxidos de sulfuro y nitrógeno, mezclas de hidrocarburos aromáticos policíclicos pre-sentes en el humo de leña son importantes co-factores de riesgo para la neoplasia cervical, particularmente en las mujeres infectadas con VPH. Estas partículas han sido clasificadas por la IARC como posibles carcinógenos a humanos. La asociación de VPH y el riesgo de lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (NIC II, NIC III y carcinoma *in situ*) evidenciados en el presente estudio y los factores de riego asociados, brindan información valiosa a las instituciones de salud pública para desarrollar mejores programas de promoción y prevención de neoplasia cervical en la región y el país (54) (55). En un estudio realizado en Armenia (Colombia) en 2007 en muestras de mujeres con sospecha de patología cervical, se tipificaron los tipos de VPH 16 y 18 por medio de PCR identificando el ADN de cada uno de estos tipos de VPH con cebadores específicos para las regiones E6 y E7 y se evaluó la actividad telomerasa utilizando el método "TRAP" (*Telomere Repeat Amplifica-tion Protocol*) con un equipo comercial (*Eliza Telomerase Detection Kit ARC Químicos*).

El estudio mostró la presencia de VPH 16 en 23,5% y VPH 18 en 29% de las muje-res estudiadas. La relación entre la presencia de VPH 16 o 18 con la actividad de la enzima telomerasa en las muestras de endocérvix mostró que el virus de alto riesgo se

relaciona con mayor actividad de esta enzima. La tipificación de VPH de alto riesgo es un importante coadyuvante en la toma de conducta clínica en mujeres con citología anormal, principalmente en casos de atipias de significado indeterminado. La actividad de la telomerasa surge como una prueba de utilidad en la detección de la infección por VPH, pero debe ser validada con nuevos estudios (57). La prueba o *test* de detección de ADN de VPH tiene una alta exactitud. Esto se de-mostró en un estudio de cohorte transversal en Bogotá (Colombia) realizado a mujeres con diagnóstico citológico de ASC-US entre octubre de 2006 y enero de 2008, donde se obtuvo una sensibilidad del 88% y una espe-cificidad de 44% al usar la prueba ADN-VPH para detectar lesiones de alto grado (NIC 2+) en mujeres con reportes de citología ASC-US y LSIL. En dicho estudio se evidenció que 21 de los 24 casos de HSIL presentaban VPH de alto riesgo (58–61). En esa misma ciudad en 2009 se realizó una investigación de corte transversal en cepillados cervicales de mujeres con diversos tipos de lesiones cervicales utilizando como técnica de apoyo la prueba Luminex MAP (una técnica automatizada altamente sensible y reproducible). En este estudio se encontró que las infecciones por los tipos VPH 16 y 18 eran más frecuentes en todos los tipos de patología del cérvix. También se determinó que las infecciones mixtas predominaron con un 78% de los casos con patología negativa, 85% NIC I, 81% NIC II, 78% NIC III y 71% cáncer cervical (62) (63). En una revisión realizada en 2008 se logró determinar la transmisión, prevalencia e incidencia de VPH. Entre los factores determinantes para adquirir la infección por VPH, se encontró el uso de anticonceptivos orales, la paridad y la infección previa por otros agentes transmisibles por vía sexual. En contraste, entre los factores que ofrecen una protección parcial contra la adquisición de VPH se encontró la circuncisión y el uso de preservativo. La identificación de VPH de alto riesgo como causa necesaria para el desarrollo de cáncer cervical ha propiciado el desarrollo de vacunas para prevenir la infección por los VPH 16, 18, 6 y 11, los dos primeros responsables del 70% de cáncer cervical y los últimos causantes de verrugas genitales. Teniendo en cuenta todo lo anterior, es necesario la introducción en el mercado de modernas pruebas primarias de tamización que permita identificar los tipos de VPH de alto riesgo para incrementar la eficiencia en la detección de cáncer uterino temprano, mejorando los programas de detección y más importante permitir un tratamiento temprano a las pacientes con lesiones precancerosas de cuello uterino. Una situación que es especialmente preocupante en la mayoría de los países en vías de desarrollo donde se diagnostican 85% de los cánceres cervicales que ocurren en el mundo (64).

>>> CONCLUSIONES

Las técnicas de detección de ADN implementadas en programas de cribado de cáncer de cuello

MEGANALIZAR
Tecnología y Calidad al servicio de la Salud

● Serología
● Endocrinología ● Química Clínica ● Marcadores Tumorales ● Marcadores Virales
● Hematología ● Inmunología ● Drogas Anticonvulsionantes ● Inmunosupresores

El Megalaboratorio de los Bioquímicos de Cuyo
Rigurosos Controles Internos y Externos de Calidad
Más de 220 laboratorios de toda la Provincia de Mendoza, confían en Meganalizar por Tecnología, Calidad y resultados en el día

FUNDADO POR 194 BIOQUÍMICOS
22 AÑOS

Sede Laboratorio | Montecaseros 2478 Mendoza | Tel. 0261 4373241/42 | mega@analizar-lab.com.ar
Administración | Belgrano 925 Mendoza | Tel. 0261 4412355/65 | gerencia@analizar-lab.com.ar

uterino permiten identificar genotípicamente el virus de papiloma humano causante de las lesiones anormales detectadas en la citología cervical. Sin embargo, estas técnicas no permiten conocer el riesgo real de las pacientes de progresar a cáncer de cuello uterino infectados con los diferentes tipos de VPH de alto riesgo además de someter las pacientes a procedimientos innecesarios que generan estrés y altos costos.

Las técnicas de detección de los niveles de ARNm de los oncogenes E6 y E7 prometen ser de gran utilidad para ser introducidas en los programas de prevención del cáncer de cuello uterino para identificar las mujeres con riesgo de desarrollar dicha patología. La limitación de las técnicas de detección de ARNm de E6 y E7 radica en que no refleja el proceso de traducción de las oncoproteínas, sino que demuestra solamente que existe transcripción. Aunque en un proceso subsiguiente, se puede detectar directamente la presencia de las oncoproteínas E6 y E7 con técnicas de inmunohistoquímica.

Aunque en Colombia se han realizado algunos estudios que demuestran la prevalencia de los genotipos de VPH esto no es suficiente. Es necesario realizar más estudios poblacionales con técnicas modernas de detección de ADN de VPH y de niveles de ARNm de los oncogenes E6 y E7 de los tipos VPH de alto riesgo con el fin de determinar la prevalencia de estos virus oncogénicos. Igualmente, se requiere la implementación de estas modernas técnicas de detección de la infección de VPH de alto riesgo en la práctica profesional diaria para mejorar las posibilidades de una detección temprana de las patologías desarrolladas por el virus.

>>> CONFLICTO DE INTERES

Los autores no presentan ningún conflicto de interés. ■

>>> BIBLIOGRAFIA

1. Gaspar J, Quintana SM, Reis RK, Gir E. Sociodemogra-phic and clinical factors of women with HPV and their association with HIV. Rev Lat Am Enfermagem 2015; 23 (1): 74–81.
2. Bernard H-U, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hau-sen H zur, de Villiers E-M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. Virology 2010 May; 401 (1): 70–9.
3. Mateos-Lindemann ML, Pérez-Castro S, Rodríguez-Ig-lesias M, Pérez-Gracia MT. Diagnóstico microbiológico de la infección por virus del papiloma humano. Enferm Infecc Microbiol Clin 2017 Nov; 35 (9): 593–602.
4. Bravo IG, Félez-Sánchez M. Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. Evol Med Public Heal 2015; 2015 (1): 32–51.
5. Cubie HA. Diseases associated with human papilloma-virus infection. Virology 2013 Oct; 445 (1–2): 21–34.
6. Sen S, Mandal P, Bhattacharya A, Kundu S, Roy Chowd-hury R, Mondal NR, et al. Impact of viral and host DNA methylations on HPV16-related cervical cancer patho-genesis. Tumor Biol 2017 May; 39 (5): 1-13.
7. Banister CE, Liu C, Pirisi L, Creek KE, Buckhaults PJ. Identification and characterization of HPV-independent cervical cancers. Oncotarget 2017 Feb 21; 8 (8): 13375–86.
8. Origoni M. E6/E7 mRNA testing for human papilloma virus-induced high-grade cervical intraepithelial disease (CIN2/CIN3): a promising perspective. Ecancermedical-science 2015 Apr 29; 9: 1–10.
9. Hernández D, Cruz J, Quintero Vega M, Bastidas M, Puig Pons J. Diseño de un sistema de PCR para la detección del virus del papiloma humano mediante el uso de oligonucleótidos degenerados de la región E6. Rev Obstet Ginecol Venez 2012; 72 (4).
10. De Guglielmo Z, Rodríguez A. Métodos utilizados en la identificación del virus de papiloma humano. An Sist Sanit Navar 2010; 33 (1): 71–7.
11. De Guglielmo Z, Rodríguez A. Marcadores para el criba-do del cáncer cervical. Rev Obstet Ginecol Venez 2016; 76 (3): 284–94.
12. Zappacosta R, Sablone F, Pansa L, Buca D, Buca D, Ros-ini S. Analytic and diagnostic performances of human papillomavirus E6/E7 mRNA test on up-to 11-year-old liquid-based cervical samples. A Biobank-Based Longi-tudinal Study. Int J Mol Sci 2017 Jul 11; 18 (7): 1–16.
13. Gonzalez MJ. ADN libre plasmático como marcador mo-lecular en lesiones pre-neoplásicas de cuello uterino y su asociación con VPH. Universidad del Rosario; 2012.
14. Terrazas S, Ibáñez C, Lagos M, Poggi H, Brañes J, Barriga MI, et al. Examen de detección de virus papiloma huma-no en el tamizaje de cáncer cervicouterino en un Servicio de Salud de Santiago, Chile. Rev Med Chil 2015; 143(1): 56–62.
15. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. Rev Med Virol 2015 Mar; 25 (1): 2–23.
16. Prakash P, Patne SU, Singh A, Kumar M, Mishra M, Gulati A. PCR and genotyping for HPV in cervical cancer patients. J Glob Infect Dis 2016; 8 (3): 100–7.
17. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical Human papillomavirus prevalence in 5 continents: Meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. J Infect Dis 2010 Dec 15; 202 (12): 1789–99.
18. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjosé S, Franceschi S, et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: A meta-analysis from cervical infection to cancer. Int J Cancer 2012 Nov 15; 131 (10): 2349–59.
19. Muñoz CM. Comparación de pruebas para la detección de Virus de Papiloma Humano (VPH) en cérvix y orina de mujeres infectadas con Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá; 2012.
20. Graham S. Keratinocyte Differentiation-Dependent Hu-man Papillomavirus Gene Regulation. Viruses 2017 Aug 30; 9 (9): 1-18.
Harden ME, Prasad N, Griffiths A, Munger K. Modula-tion of microRNA-mRNA target pairs by Human Papil lomavirus 16 oncoproteins. MBio 2017 Mar 8; 8 (1):1–14.
22. Yang L, Zhu Y, Bai Y, Zhang X, Ren C. The clinical appli-cation of HPV E6/E7 mRNA testing in triaging women with atypical squamous cells of undetermined signifi-cance or low-grade squamous intra-epithelial lesion Pap smear: A meta-analysis. J Cancer Res Ther 2017; 13
(4): 613-20.
23. Litwin T, Clarke M, Dean M, Wentzensen N. Somatic host cell alterations in HPV carcinogenesis. Viruses 2017 Aug 3; 9 (8): 2–22.
24. Szostek S, Zawilinska B, Klimek M, Kosz-Vnenchak M. HPV16 E6 polymorphism and physical state of viral ge-nome in relation to the risk of cervical cancer in women from the south of Poland. Acta Biochim Pol 2017; 64
(1): 143–9.
25. Hoppe-Seyler K, Bossler F, Braun JA, Herrmann AL, Hoppe-Seyler F. The HPV E6/E7 Oncogenes: key factors for viral carcinogenesis and therapeutic targets. Trends Microbiol 2018 Feb; 26 (2): 158–68.
26. Viarisio D, Gissmann L, Tommasino M. Human papil-lomaviruses and carcinogenesis: well-established and novel models. Curr Opin Virol 2017 Oct; 26: 56–62.
27. Klingelhutz AJ, Roman A. Cellular transformation by hu-man papillomaviruses: lessons learned by comparing high-and low-risk viruses. Virology 2012; 424 (2): 77–98.
28. Fischer M, Uxa S, Stanko C, Magin TM, Engeland K. Hu-man papilloma virus E7 oncoprotein abrogates the p53-p21-DREAM pathway. Sci Rep 2017 Dec 1; 7 (1) :1-11.
29. Loayza A. Utilidad clínica de la detección del ARNm de las oncoproteínas E6 y E7 del virus del papiloma huma-no en el seguimiento de pacientes tratadas por CIN 2-3. Universidad Autónoma de Madrid; 2014.
30. Rijkaart DC, Heideman DAM, Coupe VMH, Brink AATP, Verheijen RHM, Skomedal H, et al. High-risk human papillomavirus (hrHPV) E6/E7 mRNA testing by PreTect HPV-Proofer for detection of cervical high-grade intraep-ithelial neoplasia and cancer among hrHPV DNA-posi-tive women with normal cytology. J Clin Microbiol 2012; 50 (7): 2390–6.
31. Pardo C, Cendales R. Incidencia estimada y mortalidad por Cáncer en Colombia 2002-2006. Legis; 2010.
32. IARC. GLOBOCAN Cancer Fact Sheets: Cervical cancer [Internet]. 2012 [cited 2018 Jun 19].
33. Nowiska K, Ceisielska U, Podhorska-Okołów M, Dzigiel P. The role of human papillomavirus in oncogenic trans-formation and its contribution to the etiology of precan-cerous lesions and cancer of the larynx: A review. Adv Clin Exp Med 2017 Jun 30; 26 (3): 539–47.
34. Muñoz N, Bravo LE. Epidemiology of cervical cancer in Colombia. Colomb Med 2012; 43 (4): 298–304.
35. Angeleri AA, Díaz LB, Coliva G, Guerra F, Palaoro LA, Rocher AE. Calidad de la toma exo-endocervical en la prevención del cáncer de cuello uterino. Medicina (Bue-nos Aires) 2017; 77 (6): 512–4.
36. Palaoro LA, Rocher AE. Respuesta inflamatoria genital en la detección de alteraciones por virus del papiloma huma-no. Acta Bioquím Clín Latinoam 2013; 47 (3): 551-60.
37. Shi W, Liu H, Wu D, Tang Z, Shen Y, Guo L. E6/E7 proteins are potential markers for the screening and di-

agnosis of cervical pre-cancerous lesions and cervical cancer in a Chinese population. Oncol Lett 2017 Sep 14; 14 (5): 6251–8.
38. Halfon P, Benmoura D, Agostini A, Khiri H, Martineau A, Penaranda G, et al. Relevance of HPV mRNA detec-tion in a population of ASCUS plus women using the NucliSENS EasyQ® HPV assay. J Clin Virol 2010 Feb; 47 (2): 177–81.
39. Jeantet D, Schwarzmann F, Tromp J, Melchers WJG, van der Wurff AAM, Oosterlaken T, et al. NucliSENS® EasyQ® HPV v1 test – Testing for oncogenic activi-ty of human papillomaviruses. J Clin Virol 2009 Jul; 45(SUPPL. 1): S29–37.
40. Padalko E, Van Renterghem L, Bamelis M, De Mey A, Sturtewagen Y, Vastenavond H, et al. Prospective Evalu-ation of E6/E7 mRNA Detection by the NucliSENS Easy Q HPV Assay in a Stepwise Protocol. J Med Virol 2013; 85 (7): 1242–9.
41. Arbyn M, Roelens J, Cuschieri K, Cuzick J, Szarewski A, Ratnam S, et al. The APTIMA HPV assay versus the hybrid capture 2 test in triage of women with ASC-US or LSIL cervical cytology: A meta-analysis of the diagnos-tic accuracy. Int J Cancer 2013; 132 (1): 101–8.
42. Castle PE, Reid J, Dockter J, Getman D. The reliability of high-risk human papillomavirus detection by Aptima HPV assay in women with ASC-US cytology. J Clin Virol 2015; 69: 52–5.
43. Stoler MH, Wright TC, Cuzick J, Dockter J, Reid JL, Get-man D, et al. APTIMA HPV assay performance in women with atypical squamous cells of undetermined signifi-cance cytology results. Am J Obstet Gynecol 2013; 208
(2): 144e1-8.
44. Chernesky M, Jang D, Gilchrist J, Elit L, Lytwyn A, Smieja M, et al. Evaluation of a new APTIMA specimen collection and transportation kit for high-risk human papillomavirus E6/E7 messenger RNA in cervical and vaginal samples. Sex Transm Dis 2014; 41 (6): 365–8.
45. Ratnam S, Coutlee F, Fontaine D, Bentley J, Escott N, Ghatage P, et al. Aptima HPV E6/E7 mRNA test is as sensitive as hybrid capture 2 assay but more specific at detecting cervical precancer and cancer. J Clin Microbiol 2011; 49 (2): 557–64.
46. Heideman DAM, Hesselink AT, Van Kemenade FJ, Iftner T, Berkhof J, Topal F, et al. The aptima HPV assay fulfills the cross-sectional clinical and reproducibility criteria of international guidelines for human papillomavirus test requirements for cervical screening. J Clin Microbi-ol 2013; 51 (11): 3653–7.
47. Murphy J, Kennedy EB, Dunn S, McLachlin CM, Kee Fung MF, Gzik D, et al. HPV testing in primary cervical screening: a systematic review and meta-analysis. J Obstet Gynaecol Canada 2012; 34 (5): 443–52.
48. Serrano ML, Correa M, Medina O, Melgarejo D, Bravo MM. Tipificación de Virus del Papiloma Humano me-diante secuencia directa en mujeres con citología nor-mal. Rev Colomb Cancerol 2003; 7 (4): 18–24.
49. Piñeros M, Murillo R. Incidencia De Cáncer En Colom-bia : Cancer Incidence Estimates in Colombia : Impor-tance of Data Sources in the Obtention of Estimation Numbers. Rev Colomb Cancerol 2004; 8 (1): 5–14.
50. García DA, Arias YR, Aristizábal FA. Detección de muta-ciones en los genes K-ras, H-ras y EGFR en muestras de plasma sanguíneo y cepillado cervical de pacientes con neoplasia intraepitelial cervical (NIC) III y cáncer de cuello uterino. Colomb Med 2009; 40 (1): 34–42.
51. Dong S, Pai S, Rha S, Hildesheim A, Kurman R, Schwartz P, et al. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cer-vical carcinoma 1. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2002; 11 (1): 3–6.
52. Wiesner C, Rincón L, Gamboa Ó, Piñeros M, González M, Ortiz N, et al. Barreras para la implementación de la prueba ADN-VPH como técnica de tamización primaria para cáncer de cuello uterino en un área demostrati-va en Colombia. Rev Colomb Cancerol 2013; 17 (3): 93–102.
53. Wei YC, Chou YS, Chu TY. Detection and typing of min-imal human papillomavirus DNA in plasma. Int J Gyne-col Obstet 2007; 96 (2): 112–6.
54. Sierra Torres CH, Acosta Aragón MP, Orejuela Aristiza-bal L. Papilomavirus y Factores asociados a Neoplasia Intraepitelial Cervical de Alto Grado en Cauca, Colom-bia. Rev Salud Pública 2006; 8 (1): 47–58.
55. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a me-dium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques 1991; 10 (4): 506–13.
56. Sierra-Torres CH, Au WW, Arrastia CD, Cajas-Salazar N, Robazetti SC, Payne DA, et al. Polymorphisms for chemical metabolizing genes and risk for cervical neo-plasia. Environ Mol Mutagen 2003; 41 (1): 69–76.
57. Ruiz-hoyos BM, Loango-chamorro N, Landazuri P. Exac-titud de la actividad de la telomerasa para el diagnós-tico del virus del papiloma humano en mujeres con patología cervical en Armenia, Colombia. Rev Colomb Obstet Ginecol 2012; 63 (3): 207–14.
58. Isaza-Ruget M a, Perez G, Morales-Reyes OL, Deanto-nio-Suárez R, Alvarado-Heine C, Trujillo LM. Exactitud del test ADN-HPV para la detección la Enferm Cerv alto grado (NIC 2+) en mujeres con Anorm citológicas (ASC-US y LSIL), afiliadas a la seguridad social en Bogotá (Colombia). Rev Colomb Obstet Ginecol 2009; 60 (3): 213–22.
59. Bravo MM, Medina O, Melgarejo D, Serrano ML. Infec-ción por virus del papiloma humano en una muestra de mujeres jóvenes con citología normal. Rev Colomb Cáncerol 2004; 8 (2): 5–10.
60. Cubie HA, Cuschieri K, Murray F, Moore C. Evaluation of the sensitivity and specificity of the Roche AM-PLICOR® VPH test, the prototype line blot assay and the Digene Hybrid Capture 2 test for the detection of VPH in archieved cervical samples with borderline cy-tology. Specialist Virology Centre, Royal Infirmary of Edinburgh, UK.
61. The ASCUS-LSIL Triage Study. Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance. Am J Obstet Gynecol 2003; 188 (6): 1383–92.
62. García DA, Schmitt M, Cid-Arregui Á, Castillo M, Brice-ño I, Aristizábal FA. Genotipificación del virus del papi-loma humano (VPH) en muestras de cepillados cervica-les de pacientes de diferentes hospitales de Bogotá y evaluación de la concordancia de dos métodos basados en PCR. Rev Colomb Obstet Ginecol 2010; 61 (4).
63. Gravitt P, Hakenewerth A, Stoerker J. A direct com-parison of methods proposed for use in widespread screening of human papillomavirus infections. Mol Cell Probes 1991; 5 (1): 65–72.
64. Reina JC, Muñoz N, Sánchez GI. El estado del arte en las infecciones producidas por el virus del papiloma humano. Colomb Med 2008; 39: 189–95.

GEMATEC
equipamiento para medicina

Convertimos tecnología en confianza

Int. Avalos 3651 | (1605) | Munro
Buenos Aires, Rep. Argentina
Tel./Fax: (54 11) 4512 5666

ventas@gematec.com.ar
www.gematec.com.ar
@Gematecarg