

Universidad de Costa Rica
Sede Rodrigo Facio
Facultad de Microbiología



Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de Licenciatura en Microbiología y Química
Clínica

**“Determinación de genotipos del Virus de Papiloma Humano y análisis
con el marcador inmunohistoquímico Ki67 en biopsias con displasia
cervical de pacientes del Hospital Dr. Max Peralta de Cartago durante el
año 2013”**

Ana Lorely Blanco Chaves
A80944

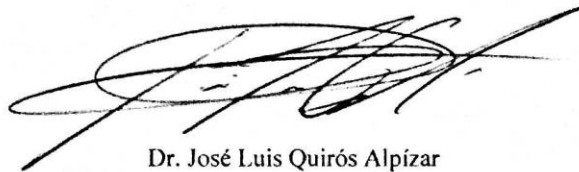
Tutora: Dra. María José Suárez Sánchez
Asesor: Dr. José Luis Quirós Alpízar
Asesor: Dr. Enrique Freer Bustamante

Julio, 2014

Los que aquí firmamos damos fe que este trabajo posee todas las correcciones indicadas el
día de la presentación:



Dra. María José Suárez Sánchez
Tutora



Dr. José Luis Quirós Alpizar
Asesor



Dr. Enrique Freer Bustamante
Asesor



Dr. Rodrigo Mora Rodríguez
Presidente del tribunal



Dra. Ana Patricia Fernández Sánchez
Profesora designada

Tabla de contenidos

Índice de abreviaturas.....	5
1. Resumen.....	6
2. Introducción.....	7
3. Marco Teórico.....	8
3.1 Lesiones cervicales y cáncer de cuello uterino.....	8
3.2 Virus de Papiloma Humano.....	10
3.3 Ciclo Infeccioso del Virus de Papiloma Humano.....	12
3.4 Patogénesis: de la infección al cáncer.....	13
3.5 Métodos diagnósticos.....	16
4. Justificación.....	20
5. Objetivos.....	22
5.1 General.....	22
5.2 Específicos.....	22
6. Metodología.....	23
6.1 Selección de las muestras.....	23
6.2 Extracción de ADN viral a partir de biopsias uterinas parafinadas.....	23
6.3 Amplificación de ADN viral mediante PCR.....	23
6.4 Hibridación y revelado.....	24
6.5 Análisis Inmunohistoquímico.....	25

7. Resultados.....	26
7.1 Detección y determinación de genotipos del VPH.....	26
7.2 Detección inmunohistoquímica del marcador Ki67.....	30
7.3 Coinfecciones.....	35
8. Discusión.....	36
9. Conclusiones.....	40
10. Literatura consultada.....	41
11. Anexos.....	47

INDICE DE ABREVIATURAS

VPH: Virus de Papiloma Humano

CIN 1: Neoplasia Cervical Grado 1 (del inglés Cervical Intraepithelial Neoplasia)

LSIL: Lesión Escamosa Intraepitelial de bajo grado (del inglés Low grade Squamous Intraepithelial Lesion)

CIN 2/3: Neoplasia Cervical Grado 2 ó 3 (del inglés Cervical Intraepithelial Neoplasia)

HSIL: Lesión Escamosa Intraepitelial de alto grado (del inglés High grade Squamous Intraepithelial Lesion)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ORF: Marco de lectura abierto (del inglés Open Reading Frame)

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

ARN: Ácido ribonucleico

OMS: Organización Mundial de la Salud

1. RESUMEN

El cáncer de cuello uterino es una de las principales causas de muerte en la población femenina a nivel mundial, ocupando en nuestro país el cuarto lugar. Se ha demostrado que el Virus de Papiloma Humano (VPH) está ligado al menos a un 99,7% de los casos, principalmente asociados a los genotipos de alto riesgo.

Se realizó un estudio de tipo descriptivo donde se implementaron técnicas moleculares como PCR e hibridación reversa para la determinación de diferentes genotipos del VPH, así como la detección inmunohistoquímica del marcador de proliferación celular Ki67 en biopsias parafinadas de cuello uterino, de pacientes del Hospital Dr. Max Peralta de Cartago, durante el año 2013.

Se logró determinar que el genotipo más frecuente entre la población en estudio fue el 39, el cual se presentó en el 53% de los casos. Además un 65% de las biopsias estudiadas presentaron infecciones mixtas del VPH.

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino es una de las enfermedades malignas más frecuentes en la población femenina a nivel mundial, donde las tasas de incidencia más altas notificadas provienen de países subdesarrollados (Hernández *et al.*, 2010). En Costa Rica, el cáncer de cérvix constituye la cuarta causa de muerte por tumor maligno en mujeres, con una tasa ajustada de mortalidad de 5.29 por cada 100 000 mujeres (Ministerio de Salud, 2014).

Aunque se han identificado diversos factores involucrados en el cáncer de cérvix y sus estados precursores, desde 1996, la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Europea de Investigación de Infecciones Anogenitales y Neoplasias, y el Instituto Nacional de Consensos en Salud en Cáncer de Cérvix reconocieron al VPH como la principal causa (Burd, 2003). Actualmente se conoce que el VPH está implicado en al menos el 99.7% de los casos de cáncer cervical en el mundo (Raji *et al.*, 2011).

Las infecciones cervicales por VPH se asocian con un amplio espectro de enfermedades, pero no todos los casos son evidenciables en la práctica ginecológica porque la infección aún no conduce a anormalidades citológicas detectables. Sin embargo, un número importante de estas pacientes posteriormente desarrollan displasia cervical de bajo y alto grado, así como cáncer de cuello uterino (Paavonen, 2007) de ahí la importancia del desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas que permitan la detección del VPH.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Lesiones cervicales y cáncer de cuello uterino

La infección del VPH está asociada con una variedad de condiciones clínicas que van desde lesiones inocuas hasta cáncer, y según su asociación con cáncer cervical y lesiones preneoplásicas se clasifican en genotipos de alto y bajo riesgo. Los genotipos de bajo riesgo incluyen al 6, 11, 42, 43 y 44, los cuales se asocian con la producción de verrugas en el tracto genital (especialmente el genotipo 6 y 11), y generalmente no son oncogénicos (Bosch, 2006). Por otro lado, los VPH de alto riesgo son causantes de lesiones que pueden ser mucho menos evidentes, sin embargo están asociados con más del 99% de los casos de cáncer de cérvix. Los genotipos 16, 18, 31, 33, 39 y 45 se clasifican dentro de este grupo (Hildesheim, 1997; Walboomers *et al.*, 1999). En el cuadro 1 se muestran las patologías asociadas a los diferentes genotipos del VPH (Burd, 2003).

Las infecciones por genotipos de alto riesgo siguen predominantemente un curso silente, tienden a establecer infecciones persistentes y generan alteraciones citológicas características englobadas frecuentemente en el grupo de Neoplasia Cervical Grado 1 (CIN 1, del inglés Cervical Intraepithelial Neoplasia) o lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LSIL, del inglés Low grade Squamous Intraepithelial Lesion). En una proporción menor las infecciones por VPH de alto riesgo pueden inducir lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (CIN 2/3 o HSIL, del inglés High grade Squamous Intraepithelial Lesion) y cáncer cervical (Hildesheim, 1997; Schiffman *et al.*, 1998).

Si bien se considera que todos los carcinomas de cérvix derivan siempre de lesiones intraepiteliales, se estima que solo un bajo porcentaje de las lesiones de bajo grado progresan. Por el momento no se cuentan con métodos de laboratorio para diferenciar entre los casos que van a progresar y los que no (Melo *et al.*, 2003).

Estudios prolongados han evidenciado la asociación entre la capacidad de progresión a CIN 2/3 o HSIL y el genotipo viral (Kitchener *et al.*, 2006; Walboomers *et al.*, 1999). En el estudio epidemiológico de Guanacaste en Costa Rica, se determinó que las infecciones por VPH 16 y 18 progresaron a lesiones de CIN 3 en un 17.2% y 13.6% de los casos respectivamente, mientras que las infecciones por otros genotipos virales de alto riesgo progresaron en un 3% (Herrero *et al.*, 2008).

Cuadro 1. Genotipos de VPH y patologías asociadas (Burd, 2003)

Patología	Tipos de VPH
Verrugas plantares	1, 2, 4, 63
Verrugas comunes	2, 1, 7, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65, 77, 1, 3, 4, 10, 28
Verrugas planas	3, 10, 26, 27, 28, , 38, 41, 49, 75, 76
Otras lesiones cutáneas	6, 11, 16, 30, 33, 36, 37, 38, 41, 48, 60, 72, 73
Epidermoplasia verruciforme	2, 3, 10, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 50
Papilomatosis respiratoria	
recurrente	6, 11
Hiperplasia epitelial de Heck	13, 32
Papilomas/Carcinomas de	
Conjuntiva	6, 11, 16
Condilomas acuminados	6, 11, 30, 42, 43, 45, 51, 54, 55, 70
Neoplasia cervical intraepitelial	
Inespecífica	30, 34, 39, 40, 53, 57, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69
Bajo riesgo	6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 74
Alto riesgo	16, 18, 6, 11, 31, 34, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 66
Carcinoma Cervical	16, 18, 31, 45, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 66, 68, 70

3.2 El Virus de Papiloma Humano

Los virus Papiloma, incluyendo al VPH, pertenecen a la familia Papovaviridae. Son virus pequeños, con un diámetro aproximado de 55 nm y no están envueltos por membrana. Tienen una cápside icosaédrica compuesta por 72 capsómeros, y su genoma viral consiste en una única molécula de ADN doble banda circular que contiene aproximadamente 7900 pares de bases (pb) asociadas a histonas. El ADN viral está formado por ocho genes, de los cuales seis codifican para proteínas tempranas (E) y dos para proteínas tardías (L). Todos los marcos de lectura abiertos (ORF, del inglés Open Reading Frame) se encuentran en una sola cadena (Muñoz *et al.*, 2006).

El genoma funcionalmente se divide en tres regiones (Figura 1):

- i. La primera es conocida como región larga de control o región reguladora, de 400 a 1000 pb, contiene el promotor para la proteína del core (p97) y diversos elementos de regulación de la transcripción y origen de replicación del virus. Es la región con el mayor grado de variabilidad en el genoma viral.
- ii. La segunda se considera una región de transcripción temprana que consiste en los ORFs E1, E2, E4, E5, E6 y E7. Las proteínas E5, E6, E7 están implicadas en la transformación neoplásica y tanto E1 como E2 en la replicación del genoma viral, también E2 regula la expresión de los genes tempranos, y particularmente reprime la expresión de los oncogenes E6 y E7.

- iii. La tercera es una región de transcripción tardía donde se encuentran los genes L1 y L2 que codifican para las proteínas estructurales de la cápside (Guittoni, 2010; Burd, 2003).

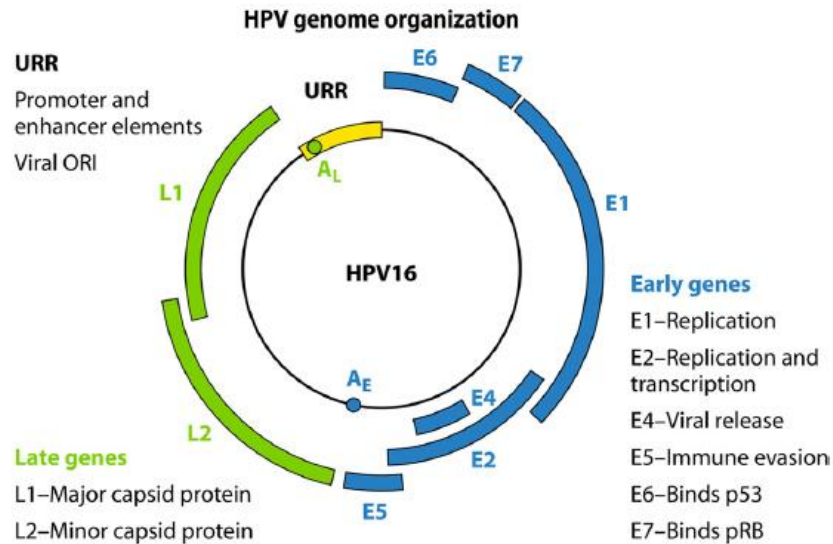


Figura 1. Representación del genoma del VPH (Stanley, 2012).

La clasificación vigente del VPH se basa exclusivamente en la caracterización del genoma. Se considera que se trata de un nuevo genotipo si las secuencias de nucleótidos de los ORF de E6, E7 y L1 presentan una homología menor de 90% con otros genotipos conocidos de VPH. Cuando la homología se sitúa en el rango de 90 a 98% indica un subtipo, y cuando la identidad es mayor de 98%, se considera que es una variante. Los genotipos son designados por números y los subtipos con letras, siguiendo un orden cronológico con respecto a su descripción. De esta manera han sido identificados más de 130 genotipos, aunque sólo unos 80 han sido completamente caracterizados (Beutner, 1997).

3.3 Ciclo Infeccioso del VPH

El VPH es un patógeno exclusivamente intraepitelial, la infección y multiplicación son dependientes de la diferenciación del queratinocito. El virus infecta células basales a través de microabrasiones del epitelio pero la expresión génica, la producción de proteínas virales y el ensamblaje viral ocurre en el estrato espinoso y granuloso del epitelio escamoso (Figura 2) (Stanley, 2012).

Se ha propuesto que la $\alpha 6$ - integrina es posiblemente el receptor celular para el VPH - 6, mientras que el heparán sulfato de la superficie celular permite que el VPH - 16 y el VPH - 33 se puedan adherir a sus células hospederas. Además, se sugiere que es posible que un receptor secundario o proteoglicanos estabilizadores también pueden estar implicados en la unión del VPH, sin embargo los factores necesarios para la captación del virión aún no se conocen (Burd, 2003).

Las células de la capa basal se dividen continuamente y proveen un reservorio para las regiones suprabasales. Después de la infección en los queratinocitos basales se da una ronda de replicación donde se producen de 50 a 100 copias extra cromosómicas del ADN viral por célula. Este número de copias se mantiene constante en los queratinocitos basales indiferenciados mientras transcurre la infección (Doorbar, 2005)

En los episomas, la expresión de genes virales es mínima, la expresión de los oncogenes E6 y E7 está bajo un control muy estricto, sus proteínas son poco detectables, y posteriormente se da la integración viral en las células. Cuando el queratinocito infectado entra al compartimento de diferenciación, sale del ciclo celular, ocurre replicación del ADN

viral, el número de copias aumenta por lo menos a 1000 copias por célula e incrementa la expresión de los genes E6, E7 y los genes tardíos (Stanley, 2012; Doorbar, 2005)

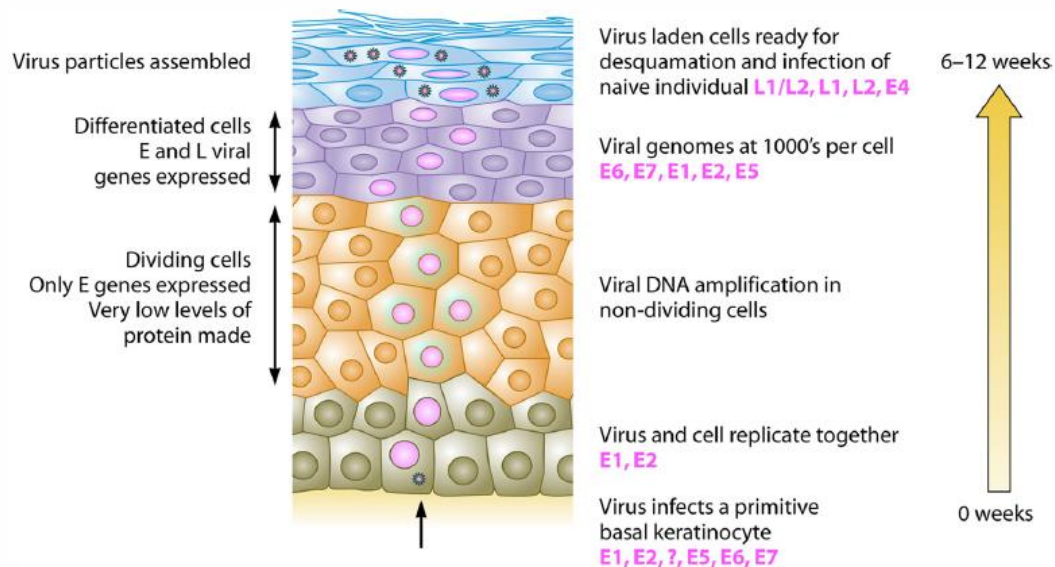


Figura 2. Representación del ciclo de infección del VPH en el epitelio escamoso (Burd, 2003).

3.4 Patogénesis: de la infección al cáncer

El genoma del VPH codifica sólo para entre 8 y 10 proteínas, por lo que requiere de la maquinaria celular para la regulación y la transcripción viral. Sin embargo, la ADN polimerasa y otros factores de replicación se producen en células mitóticamente activas y el queratinocito está destinado a salir del ciclo celular. Para sobrevivir, el virus debe codificar proteínas que activen el ciclo celular en células que no están en división, inhibir la apoptosis y retrasar la diferenciación del queratinocito para crear un ambiente permisivo para la replicación viral (Burd, 2003; Stanley, 2012).

Al inicio de la infección, como se mencionó anteriormente, el número de copias virales es bajo y estas se encuentran extracromosómicamente, como episomas. Durante esta etapa el ADN viral se distribuye difusamente por las células basales proliferantes y al mantenerse un número de copias reducido, no se despierta una respuesta inmunológica (Muñoz *et al.*, 2006).

Cuando el queratinocito entra al compartimento de diferenciación y sale del ciclo celular, se da la integración del ADN viral al ADN del huésped. Dicha integración usualmente causa una delección o alteración del gen viral regulador E2, la cual provoca la pérdida del control negativo de la expresión de E6 y E7. Los transcritos provenientes del virus integrado son más estables que los derivados del ADN viral episomal por lo que la integración ha sido asociado con una ventaja de crecimiento selectiva para las cepas del VPH que logren integrarse en el genoma celular, como lo hace el genotipo 16 (Muñoz *et al.*, 2006).

Los productos génicos de E6 y E7 en una infección productiva por VPH causan una desregulación del ciclo celular del huésped uniéndose e inactivando la expresión de proteínas supresoras de tumores, ciclinas celulares y quinasas dependientes de ciclinas con el fin de facilitar la replicación viral en una célula que ha concluido su diferenciación y que ya ha salido del ciclo celular (Burd, 2003).

La proteína E6 se une a p53 (proteína supresora de tumores) convirtiéndola en un blanco para la enzima ubiquitina ligasa, lo cual produce su degradación en el proteosoma. Esta degradación tiene como consecuencia el bloqueo de las funciones normales de p53, como inhibición en G1, apoptosis y reparación del ADN dañado. Las proteínas de E6 de los

virus de bajo riesgo no se unen a p53 a niveles detectables y no tienen ningún efecto en la estabilidad de p53 *in vitro* (Guittoni, 2010).

El producto génico de E7 se une a la forma hiperfosforilada de las proteínas de la familia Rb (proteína del retinoblastoma). Esta unión interrumpe la unión del complejo Rb y el factor de transcripción E2F-1 liberando dicho factor y de esta forma se da la transcripción de genes cuyos productos son necesarios para que la célula entre a la fase S del ciclo celular (Figura 3). E7 también puede unirse a otras proteínas mitóticas como ciclina E. El resultado final es una estimulación de la síntesis de ADN y proliferación celular. Las proteínas E7 de los VPH de bajo riesgo se unen a Rb con poca afinidad (Guittoni, 2010).

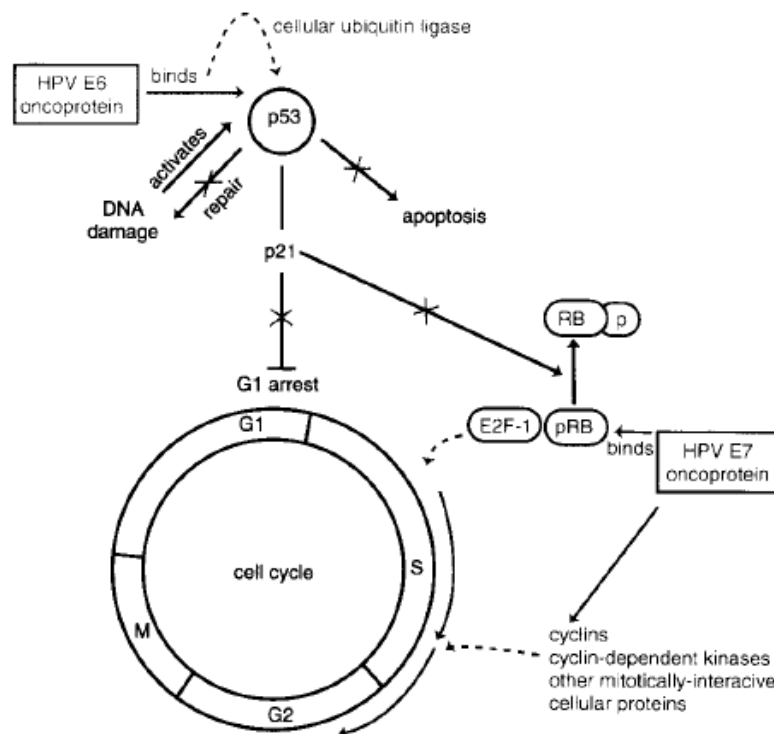


Figura 3. Efecto de las proteínas E6 y E7 sobre el ciclo celular del VPH (Burd, 2003).

De esta manera, el ADN viral se replica y el virus se ensambla en una célula destinada a morir, por lo que no hay ni citólisis inducida por el virus ni necrosis, no se genera inflamación y la activación de las células dendríticas se dificulta así como la generación de una respuesta inmune efectiva. Además, el VPH no produce viremia y al igual que todos los virus ADN, tiene mecanismos para inhibir la síntesis de interferón por la célula hospedera. Estas características virales generan infecciones crónicas por largos períodos de tiempo sin que sean detectadas por el sistema inmune del hospedero (Pett *et al.*, 2004).

3.5 Métodos diagnósticos

Para la detección tanto de la infección viral, como de las lesiones que causa el VPH se han implementado diferentes técnicas. La citología convencional con la tinción de Papanicolaou sigue siendo una de las principales técnicas para la detección de displasias, especialmente las ocasionadas por VPH de alto riesgo. La prueba de Papanicolaou es una herramienta de evaluación que busca cambios en las células de la zona de transformación del cuello uterino, donde en la mayoría de los casos los cambios son ocasionados por el VPH. (Webersinke, *et al.*, 2013; Roland *et al.*, 2011).

La citología de monocapa es una técnica de amplio uso actual. La muestra se obtiene a partir de un cepillado cervical al igual que en la citología convencional, pero en este caso se coloca en una solución conservante. Al utilizar esta técnica se facilita el análisis de la muestra, ya que las células son colocadas en una sola capa y además el tratamiento que se lleva a cabo permite descartar posibles artefactos, eliminar la mayor cantidad de moco, proteínas, células sanguíneas, levaduras, bacterias, dejando una muestra

limpia para la búsqueda de células anormales (Alameda *et al.*, 2007; Hutchinson *et al.*, 1999).

Las pacientes que presentan resultados anormales de Papanicolaou, se evalúan mediante colposcopia y de ser necesario con biopsia dirigida por colposcopia. En esta técnica se explora el cuello uterino por medio de un colposcopio, el cual da una imagen aumentada del tejido. También se puede aplicar una solución de ácido acético al 3%, permitiendo la observación de patrones características de displasia o carcinoma. En caso que las anomalías no se logren detectar o toda la unión escamo - columnar no pueda ser visualizada, se realiza una biopsia de cono cervical (Boulanger *et al.*, 2011; van Niekerk *et al.*, 1998).

La biopsia se puede utilizar para confirmar la mayoría de los diagnósticos, mediante la observación de características patológicas de la infección por VPH, tales como la hiperplasia epitelial (acantosis) y la vacuolización citoplasmática degenerativa (coilocitosis), en los queratinocitos diferenciados terminales con núcleos atípicos (Webersinke *et al.*, 2013).

La hibridación *in situ* se puede utilizar para detectar el ADN o ARN del VPH presente en biopsias. Se utilizan sondas marcadas con algún radioisótopo, fluorocromo o enzima, y son detectados posteriormente por radiactividad, fluorescencia, o formación de una reacción cromogénica. En la hibridación *in situ* se pueden detectar secuencias de ácidos nucleicos del VPH dentro de las células individuales, y se puede realizar un estudio histopatológico simultáneo de las alteraciones morfológicas (Pannone, 2012).

De forma similar la técnica de hibridación reversa permite la detección de ácidos nucleicos del virus, pero en este caso se debe realizar previamente un paso de extracción y amplificación del ADN viral. Posteriormente se lleva a cabo la hibridación con secuencias genómicas del VPH unidas de forma covalente a membranas de nylon. La detección de diferentes genotipos virales se puede visualizar por reacciones con conjugados que propician un cambio de color en los sitios donde se haya dado la hibridación (Kleter *et al.*, 1999).

Se han creado también ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tipo específicos, que se basan principalmente en las variaciones de las secuencias de los genes E6 y E7 de los diferentes genotipos del VPH, especialmente los de alto riesgo. Se presenta una sensibilidad analítica que puede variar entre 10 y 200 genomas de VPH por muestra, dependiendo de la técnica que se utilice (Herrel *et al.*, 2009; Mori *et al.*, 2011).

La captura de híbridos, especialmente en su versión II (hc2) es ahora muy utilizada. En una primera etapa se realiza una desnaturalización del ADN, el cual será hibridado a sondas de ARN, posteriormente se realiza la captura de híbridos ADN-ARN en una fase sólida y se hacen reaccionar con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina, se genera una señal quimioluminiscente amplificada que permite la detección cualitativa del VPH (Tenna *et al.*, 2005).

Las técnicas inmunohistoquímicas también se han usado para detectar alteraciones causadas por el VPH, un ejemplo es la expresión de la proteína nuclear Ki67. Esta proteína está directamente relacionada con la proliferación celular, por lo cual es ampliamente

utilizada como complemento en el diagnóstico de procesos tumorales (Klimowicz *et al.*, 2012).

Ki67 es una proteína nuclear no histónica que se expresa en todas las fases del ciclo celular (G1, S, G2 y M) pero estando ausente en células en reposo (fase G0), por lo que es un marcador ideal en tejidos neoplásicos. En un tejido normal, como es el caso del epitelio escamoso, la capa basal es la zona donde se ubica el compartimento celular en proliferación, donde se detectaría el marcaje con Ki67, y en los casos donde se presenta una displasia cervical, se puede detectar un marcaje en las capas superiores. Una señal de proliferación sostenida es una evidencia de transformación maligna. Además, Ki67 se utiliza para verificar que las displasias sean de alto o bajo grado, debido a que puede existir un sesgo en el diagnóstico morfológico en la histopatología (Jackson *et al.*, 2012; Klimowicz *et al.*, 2012).

4. JUSTIFICACIÓN

Las lesiones producidas por VPH a nivel genital son la enfermedad de transmisión sexual generada por un agente viral más frecuente a nivel mundial. Cada año se asocia con al menos 500 000 nuevos casos de cáncer cervical y 250 000 muertes por cáncer de cuello uterino en el mundo (Paavonen, 2007). Nuestro país no es la excepción, ya que según datos del Ministerio de Salud, en Costa Rica el cáncer de cuello uterino ocupa el cuarto lugar de muertes por malignidades en mujeres (Ministerio de Salud, 2014), de ahí que su estudio debe ser considerado de gran importancia.

Estudios prolongados de cohorte han evidenciado asociación de la capacidad de progresión de las lesiones intraepiteliales con el genotipo viral que está causando la infección, por esta razón, se ha propuesto el uso de métodos moleculares para la tipificación del VPH involucrado en las lesiones de diferente grado en busca de una base de conocimiento que permita asociar éstas al riesgo que tienen las mujeres costarricenses de desarrollar lesiones displásicas de alto grado.

Cabe destacar que actualmente la biopsia se considera el estándar de oro para el diagnóstico clínico de lesiones intraepiteliales de cuello uterino, y complementarlo con pruebas moleculares, así como con marcadores inmunohistoquímicos puede ser de gran ayuda para el diagnóstico y seguimiento de las pacientes.

En nuestro país se ha realizado tipificación de VPH a partir de citologías cervicales, por lo que se realizó la tipificación del VPH usando bloques de tejido de cuello uterino

parafinado, donde, a partir de diferentes cortes de solo una muestra se puede implementar tanto el análisis histológico, la inmunohistoquímica así como la tipificación del VPH.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar los genotipos de VPH según el grado de lesión displásica y detección inmunohistoquímica del marcador Ki67 en 34 biopsias de cuello uterino de mujeres que asistieron a consulta al servicio de Ginecología del Hospital Dr. Max Peralta de Cartago en el año 2013.

5.2 Objetivos específicos

1. Realizar la técnica de PCR e hibridación reversa para la detección y tipificación del VPH en 34 biopsias de cuello uterino procesadas en el año 2013 en el Hospital Dr. Max Peralta de Cartago.
2. Detectar la proliferación celular maligna en 15 biopsias de cuello uterino de pacientes del Hospital Dr. Max Peralta de Cartago del año 2013, por medio de la detección inmunohistoquímica del marcador Ki67.
3. Determinar la frecuencia de diferentes genotipos del VPH en 34 biopsias de cuello uterino de pacientes del Hospital Dr. Max Peralta de Cartago, en el año 2013.
4. Determinar la frecuencia de coinfecciones por diferentes genotipos de VPH en 34 biopsias de cuello uterino de pacientes del Hospital Dr. Max Peralta de Cartago, en el año 2013.

6. METODOLOGÍA

6.1 Selección de las muestras

Se trabajó con 34 biopsias de cuello uterino, de mujeres que asistieron a consulta al Servicio de Ginecología del Hospital Dr. Max Peralta de Cartago en el año 2013. Estas biopsias fueron facilitadas por el servicio de patología de este centro médico. Se seleccionaron como muestras de estudio biopsias de tejido de cuello uterino parafinado, y con lesión displásica (anormalidad en el aspecto celular). Se evaluaron 17 muestras con lesión de bajo grado y 17 muestras con lesión de alto grado. Además se incluyó como control negativo tejido parafinado de trompas de Falopio, ya que en este tejido no se presenta infección por VPH.

6.2 Extracción de ADN viral a partir de biopsias uterinas parafinadas

Se realizó extracción de ADN genómico del VPH siguiendo el protocolo “Puregene Tissue Kit” de Quiagene a partir del tejido parafinado de cuello uterino, según se describe en el procedimiento “DNA Purification from FFPE Tissue Using the Gentra Puregene Tissue Kit (Gentra® Puregene® Handbook, 2011).

6.3 Amplificación de ADN viral mediante PCR

Se realizó PCR para amplificar las regiones E6 y E7 de 19 genotipos del VPH: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73 y 82, para lo cual se utilizó el Kit comercial PAPILLOMASTRIP (OPERON S.A).

Se emplearon primers específicos para cada uno de los 19 genotipos de VPH y se utilizó el gen de β -globina (BGB) como control e indicador de ausencia de inhibidores de la PCR en la muestra de ADN amplificada (incluido en el kit comercial). La mezcla de reacción se realizó según el procedimiento indicado en el Kit PAPILLOMASTRIP (OPERON S.A). La amplificación del ADN se ejecutó de la siguiente manera: 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de: 94 °C, 1 min; 58 °C, 1 min; 72 °C, 1 min; 72 °C, 5 min; 4 °C. Las muestras amplificadas se congelaron a -20 °C, hasta su posterior análisis.

6.4 Hibridación y revelado

Para la hibridación se utilizaron membranas de nylon con sondas unidas de forma covalente del Kit PAPILLOMASTRIP (OPERON S.A), para detección de los diferentes genotipos de VPH en estudio, además de una sonda para el control de amplificación (BGB).

La detección de los fragmentos hibridados a las diferentes sondas se realizó mediante el uso de un conjugado (estreptavidina-peroxidasa) por unión a una marca de biotina añadida a los fragmentos de ADN amplificados durante la PCR. Tras la adición de un sustrato de la peroxidasa (TMB) se generó un precipitado de color azul donde se presentaba la hibridación.

Como resultado final de la prueba se obtuvo un patrón de bandas que se interpretó siguiendo el patrón de una tira control incluida en el kit utilizado.

6.5 Análisis Inmunohistoquímico

Se realizó la detección inmunohistoquímica de la proteína Ki67, según se indica en el protocolo “Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-1, Code M7240” de Dako (Dako, 2011).

7. RESULTADOS

7.1 Detección y determinación de genotipos del VPH

Para la extracción del ADN viral se utilizó la metodología “Puregene Tissue Kit” de Quiagene ya que fue la técnica que mostró mejor recuperación del ADN. Posteriormente, se implementó la técnica de PCR e hibridación reversa para determinar los genotipos del VPH en las diferentes muestras en estudio (Figura 5, 6 y 7).

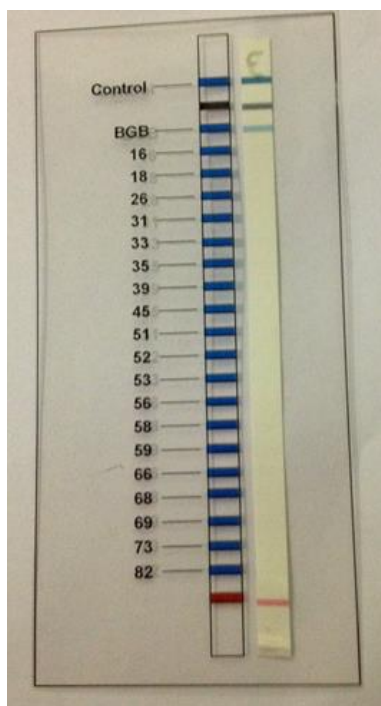


Figura 5. Hibridación reversa. Se muestra un control negativo (Tejido de trompas de Falopio), se observa cómo se tiñen los controles de hibridación, la BGB que es el control de amplificación durante la PCR, y una línea negra y una roja que son los controles de posicionamiento de la tira.

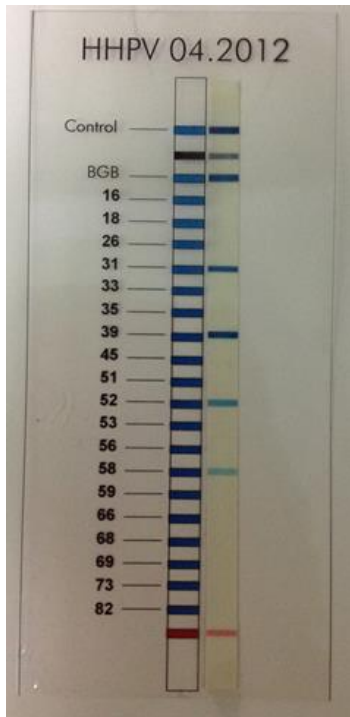


Figura 6. Hibridación reversa. Se muestra el resultado de una hibridación reversa positiva por los genotipos del VPH 31, 39, 52 y 58.

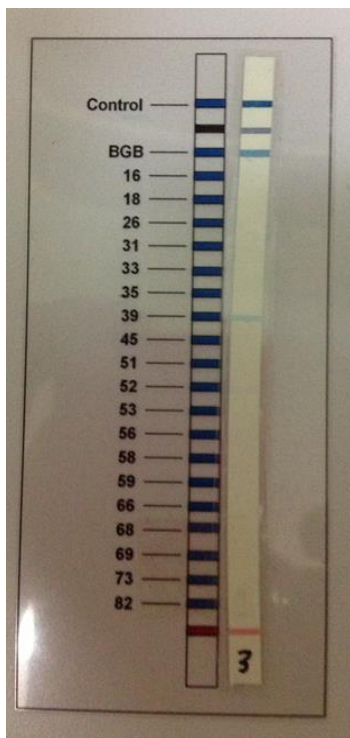


Figura 7. Hibridación reversa. Se muestra el resultado de una hibridación reversa positiva por el genotipo 39 del VPH.

Se determinó la frecuencia de diferentes genotipos del VPH en 34 biopsias cervicales de pacientes del Hospital Dr. Max Peralta de Cartago durante el año 2013, donde se obtuvo como resultado que el genotipo más común de VPH fue el 39, el cual se presentó en el 53% de las biopsias, mientras que el menos frecuente fue el 35 el cual se presentó solo en uno de los 34 casos estudiados (Cuadros 3 y 4).

El genotipo 16 se presentó en el 35,3% de los casos estudiados, mientras que el genotipo 18 se detectó en el 23,5% de las biopsias (Cuadro 4).

Los genotipos 26, 33, 45, 59, 66, 68, 69, 73 y 82, no fueron detectados en ninguna de las biopsias estudiadas.

Dentro del grupo de lesiones de bajo grado el genotipo que se detectó más frecuentemente fue el 18, el cual estaba presente en el 53% de estos casos (9 de las 17 biopsias); el genotipo 16 se detectó solo en 2 de las 17 biopsias con lesiones de bajo grado estudiadas.

Por otro lado, en el grupo de lesiones cervicales de alto grado estudiadas, el genotipo más común fue el 39 (en el 70% de las biopsias). El genotipo 18 no se detectó en ninguna de estas biopsias y el genotipo 16 se presentó en el 59% de las biopsias.

Cuadro 3. Genotipos de VPH en biopsias uterinas de pacientes del hospital Max Peralta de Cartago en el año 2013.

Muestra	Genotipos	Lesión displásica
1	56	Bajo grado
2	31, 39, 52, 56, 58	Alto grado
3	31, 39, 52, 58	Alto grado
4	16, 39, 58	Alto grado
5	16, 39, 52, 56, 58	Alto grado
6	16, 39, 58	Alto grado
7	39, 52	Alto grado
8	39	Alto grado
9	31, 39, 52, 58	Alto grado
10	31, 39, 58	Bajo grado
11	31, 39, 52, 58	Bajo grado
12	31, 39, 52	Bajo grado
13	16, 31, 39, 52, 58	Alto grado
14	16	Alto grado
15	16, 39, 58	Alto grado
16	58	Alto grado
17	18, 53	Bajo grado
18	18, 51, 53	Bajo grado
19	18, 35, 39, 51, 53	Bajo grado
20	16, 18	Bajo grado
21	56	Bajo grado
22	18	Bajo grado
23	16, 18	Bajo grado
24	18, 51, 53	Bajo grado
25	39	Alto grado
26	16, 39, 52, 58	Alto grado
27	31, 39, 58	Bajo grado
28	16, 31, 58	Alto grado
29	39	Bajo grado
30	18, 51, 53	Bajo grado
31	16	Alto grado
32	16	Alto grado
33	Negativo ¹	Bajo grado
34	18	Bajo grado
Control Negativo	Negativo ²	
Control Negativo	Negativo ²	
Control Negativo	Negativo ²	

¹ Negativo para los genotipos de VPH en estudio.

² Como controles negativos se utilizaron tejidos de Trompas de Falopio.

Cuadro 4. Frecuencia de los genotipos de VPH en biopsias cervicales de pacientes del Hospital Dr. Max Peralta de Cartago, en el año 2013.

Genotipo	16	18	31	35	39	51	52	53	56	58
Frecuencia (%)	35,3	23,5	26,5	2,9	52,9	11,8	26,5	14,7	11,8	41,2

7.2 Detección inmunohistoquímica del marcador Ki67

Sé realizó detección inmunohistoquímica del marcador Ki67 en 15 biopsias cervicales, de donde se obtuvieron los siguientes resultados:

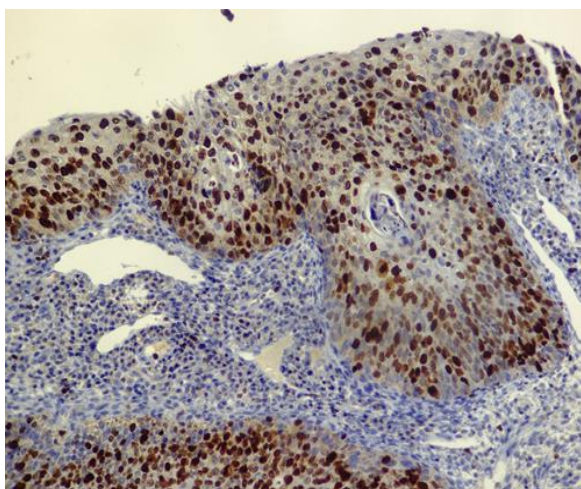


Figura 5. Muestra de alto marcaje con Ki67.

La muestra corresponde a coinfección por VPH genotipos 16, 39 y 58 (determinado por hibridación reversa en el estudio).

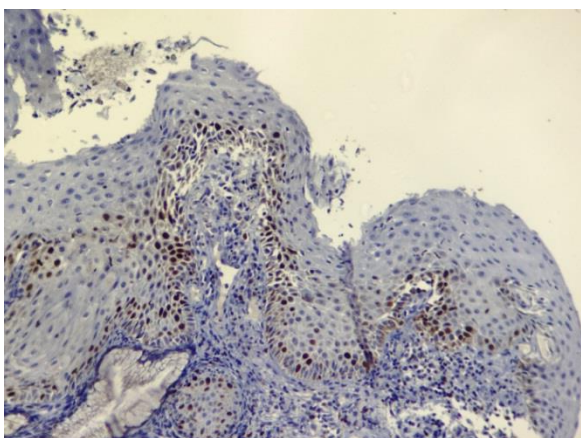


Figura 6. Muestra de bajo marcaje con Ki67.

Corresponde a una coinfección por VPH de los genotipos 31, 39, 52, 56, 58 (determinado por hibridación reversa en el estudio).

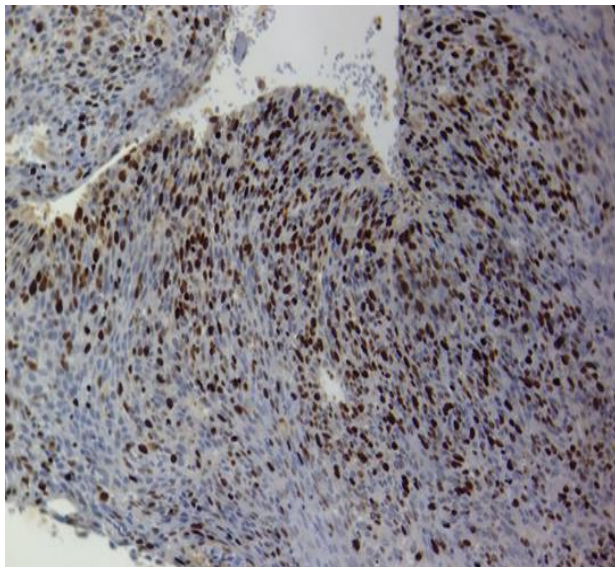


Figura 7. Muestra de alto marcaje con Ki67. Corresponde a infección por VPH de los genotipos 16, 31, 39, 52, 58 (determinado por hibridación reversa en el estudio).

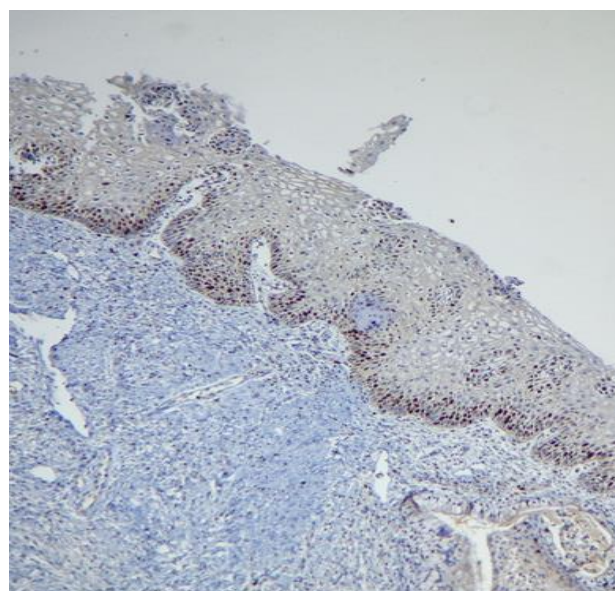


Figura 8. Muestra de bajo marcaje con Ki67. Corresponde a una infección por VPH genotipo 39 (determinado por hibridación reversa en el estudio).

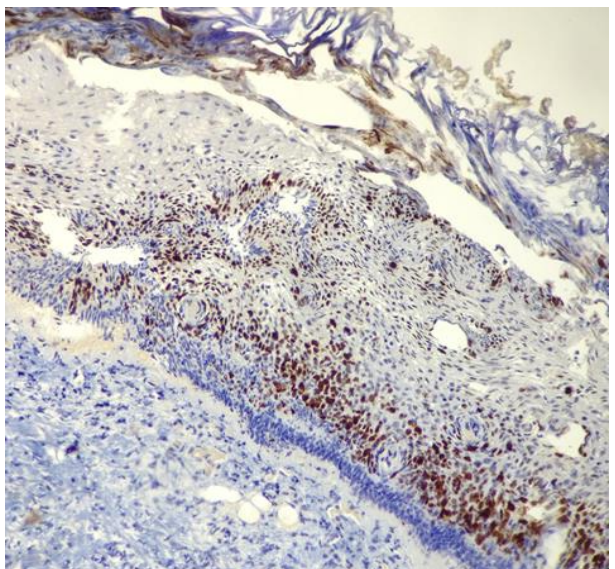


Figura 9. Muestra de alto marcaje con ki67. Corresponde a una infección por VPH genotipo 16 (determinado por hibridación reversa en el estudio).

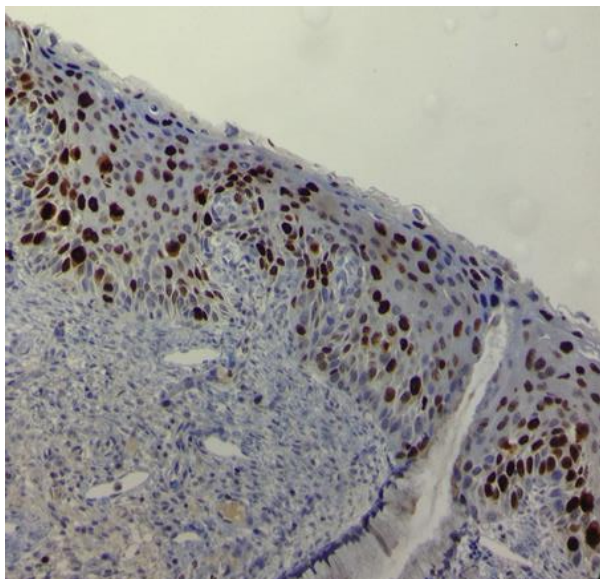


Figura 10. Muestra de alto marcaje con Ki67. Corresponde a coinfección por VPH genotipos 16, 39 y 58 (determinado por hibridación reversa en el estudio).

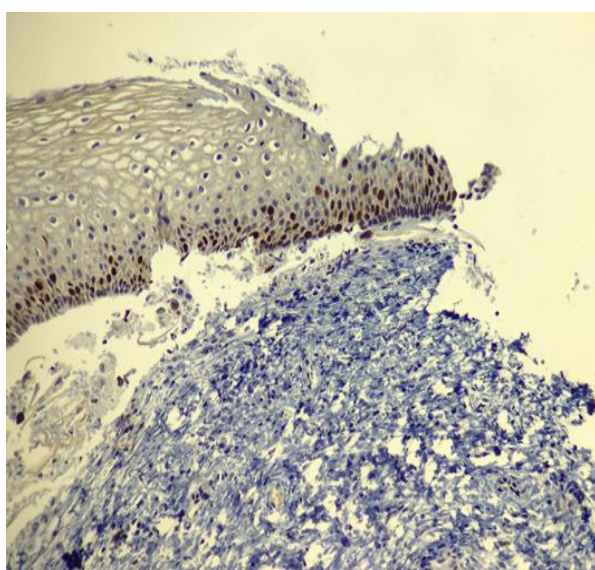


Figura 11. Muestra de bajo marcaje con Ki67. Corresponde a infección por VPH genotipo 56 (determinado por hibridación reversa en el estudio).

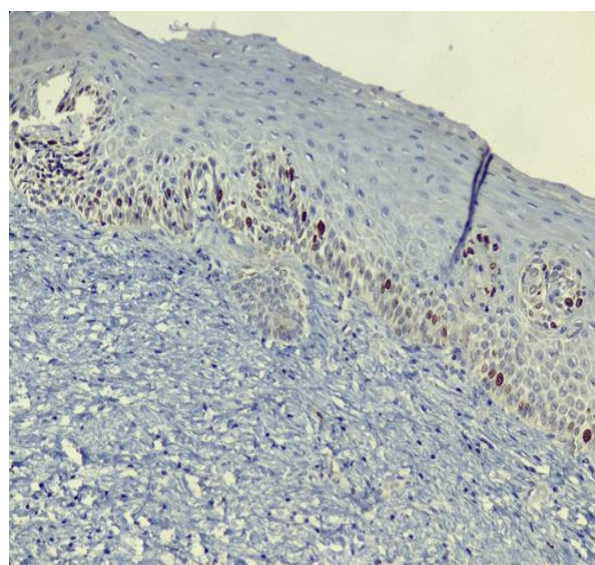


Figura 12. Muestra de bajo marcaje con Ki67. Corresponde a infección por VPH genotipos 18, 51 y 53 (determinado por hibridación reversa en el estudio).

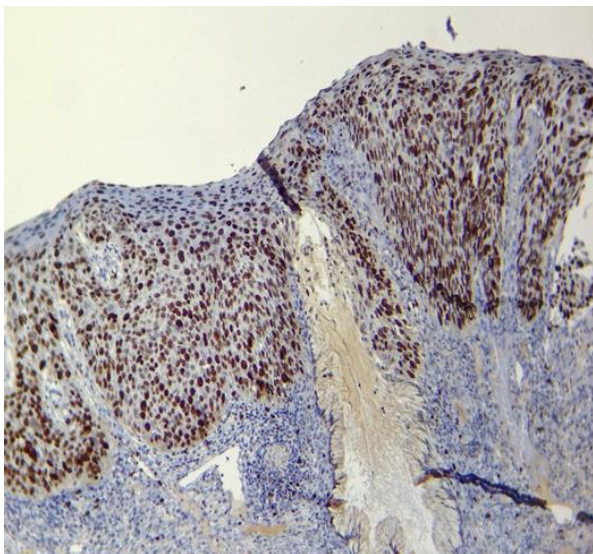


Figura 13. Muestra de alto marcaje con Ki67. Corresponde a infección por VPH genotipo 16 (determinado por hibridación reversa en el estudio).

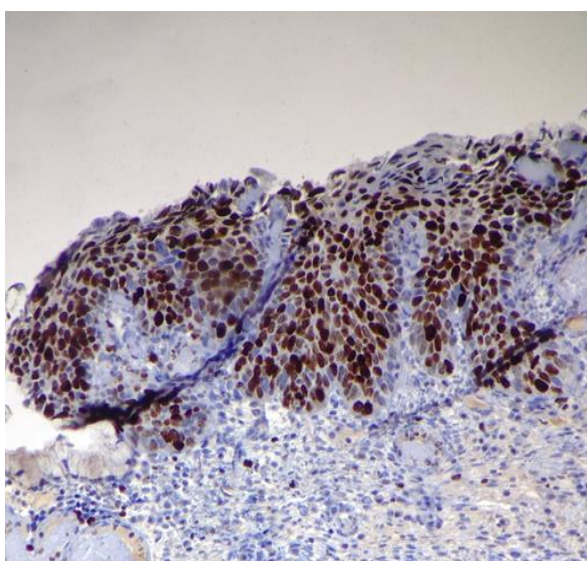


Figura 14. Muestra de alto marcaje con Ki67. Corresponde a infección por VPH genotipo 58 (determinado por hibridación reversa en el estudio).

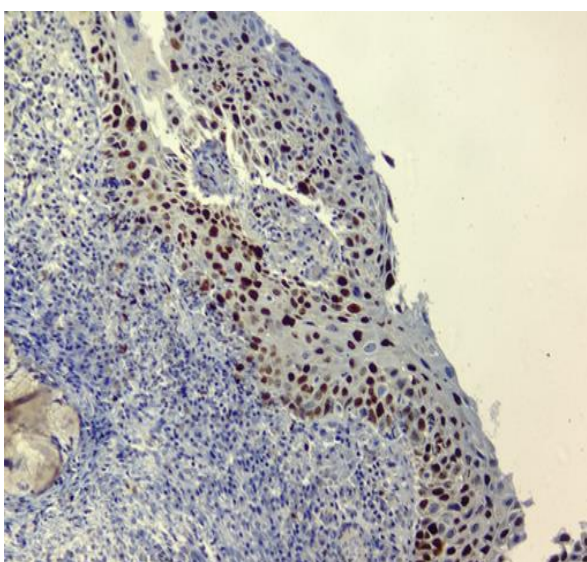


Figura 15. Muestra de alto marcaje con Ki67. Corresponde a coinfección por VPH genotipos 16, 39, 52, 56, 58 (determinado por hibridación reversa en el estudio).

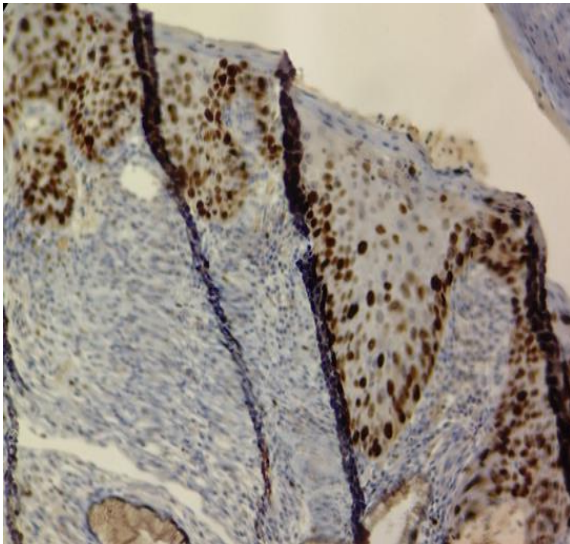


Figura 16. Muestra de alto marcaje con Ki67. Corresponde a infección por VPH genotipo 16 (determinado por hibridación reversa en el estudio).

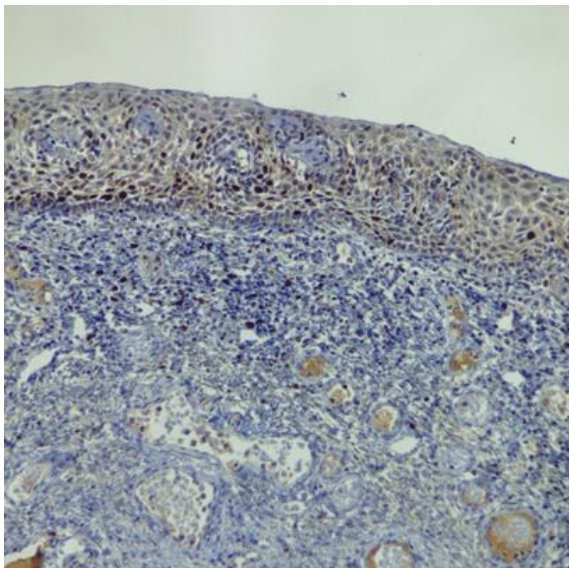


Figura 17. Muestra de alto marcaje con Ki67. Corresponde a coinfección por VPH genotipos 39, 52 (determinado por hibridación reversa en el estudio).

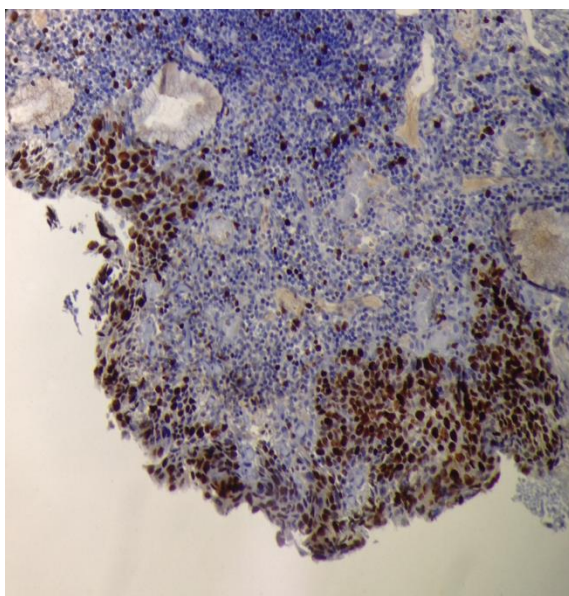


Figura 18. Muestra de alto marcaje con Ki67. Corresponde a coinfección por VPH genotipos 31, 39, 52, 58 (determinado por hibridación reversa en el estudio).

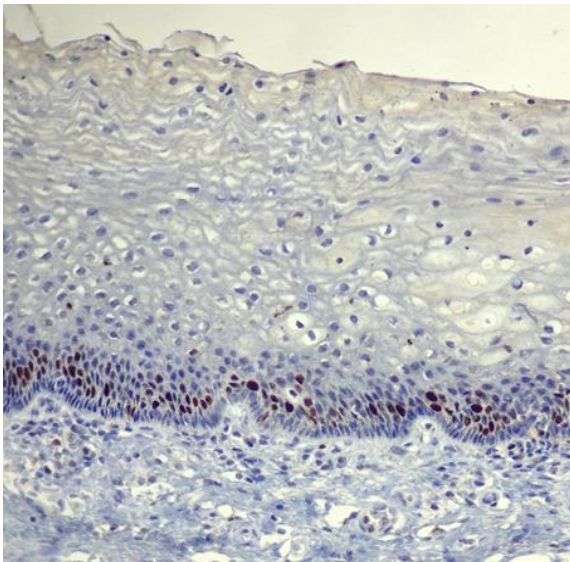


Figura 19. Muestra de bajo marcaje con Ki67, se limita a la capa basal.

7.3 Coinfecciones

Se pudo determinar que en el 64,7% de las biopsias estudiadas se presentaban coinfecciones, siendo en la mayoría de los casos por más de 3 genotipos diferentes del VPH. En el 35,3% de las muestras solo se detectó la presencia de un genotipo del virus (Cuadros 3 y 4).

La asociación más frecuente fue entre los genotipos 31, 39, 52 y 58, los cuales se presentaron de forma conjunta en el 14,7% de las biopsias. El genotipo 16 se detectó formando coinfecciones en el 26,5% de las muestras, mientras que el genotipo 18 se encontró en el 20,5% de las biopsias estudiadas. En dos de los 34 casos estudiados se detectó la presencia de VPH genotipos 16 y 18 causando infección en tejido uterino en forma conjunta.

8. DISCUSIÓN

La determinación del genotipo de VPH causante de lesiones uterinas se torna importante para ayudar en el diagnóstico y guiar el tratamiento de las pacientes que lo padecen. Si en nuestro país se lograra implementar la determinación del genotipo de VPH causante de la infección, podría enfocarse el tratamiento en aquellas pacientes que presentan LSIL o HSIL ocasionadas por virus de alto riesgo, guiando así el seguimiento en la prevención del avance de la lesión y del cáncer uterino.

Actualmente se indica que la detección de los genotipos de VPH en muestras cervicales, usando técnicas de biología molecular se torna indispensable, y para un futuro cercano debe incluirse como método de rutina acompañando a la citología cervicovaginal, para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer de cérvix, especialmente en mujeres mayores de 30 años (Chacón *et al.*, 2006).

El genotipo 39 fue el más frecuente en las biopsias estudiadas, el cual se detectó en el 52,9% de los casos. Este genotipo se ha descrito como uno de los más comunes en América Latina, con respecto al resto del mundo (Ríos *et al.*, 2010). Se podría especular que en los 34 casos estudiados, circula una variante bastante virulenta, la cual podría estar contribuyendo de una forma importante en la transformación maligna del cáncer cervical, especialmente considerando que la frecuencia más alta de este genotipo se presentó en las lesiones cervicales de alto grado.

Las investigaciones indican que los principales genotipos de alto riesgo detectados tanto en lesiones como en carcinomas cervicales son el 16 y 18, con frecuencias del 50%

para el genotipo 16 y del 20% para el genotipo 18 (Muñoz *et al*, 2003; Smith *et al*, 2007), se puede resaltar que ambos fueron detectados de forma importante en las biopsias estudiadas. En las lesiones cervicales de alto grado el genotipo 16 fue detectado en el 59% de las biopsias, y el genotipo 18 fue detectado mayormente en las lesiones de bajo grado (en el 53% de los casos). Al detectarse un genotipo como el 16 y el 18 aún en lesiones de bajo grado, debe ser siempre punto de atención puesto que las investigaciones demuestran que existe asociación directa entre los genotipos de VPH de alto riesgo y la futura progresión de la lesión displásica. (Kitchener *et al.*, 2006; Walboomers *et al.*, 1999; Herrero *et al.*, 2008).

Además, en la mayoría de las biopsias estudiadas se detectaron coinfecciones por VPH (en el 64,7%), donde en muchos casos, los genotipos 16 o 18 se presentaron en asociación con otros genotipos del virus, con lo que se podría especular que el principal causante de las lesiones en estas pacientes sean estos genotipos del virus, al ser los que se han asociado de forma más importante a la aparición de lesiones displásicas, especialmente de alto grado y cáncer (Muñoz *et al*, 2003; Smith *et al*, 2007).

A lo largo del tiempo se han desarrollado cantidad de investigaciones enfocadas en el estudio de las coinfecciones del VPH, y aunque aún no existe un panorama claro de su importancia clínica, se han asociado especialmente con pacientes que presentan lesiones cervicales de alto grado (García *et al.*, 2013).

Se ha indicado que las infecciones múltiples se pueden asociar a reinfecciones, lo que podría llevar a una mayor persistencia y progresión de la infección (García *et al.*,

2013), de ahí la importancia de la detección de los diferentes genotipos del virus por técnicas como la hibridación reversa usada en el presente estudio.

Es importante además rescatar la importancia de la detección temprana de los genotipos que están causando las lesiones cervicales, especialmente en las de bajo grado. Si se logra determinar que estas lesiones están siendo causadas por genotipos de VPH de alto riesgo, como se evidenció en muchas de las biopsias estudiadas en el presente estudio, permite al médico tratante dar un enfoque especial a estas pacientes, ya que existe un mayor riesgo de que en el futuro desarrollen una lesión de alto grado, e incluso un carcinoma cervical.

En el caso de marcadores inmunohistoquímicos, como es el caso del Ki67, pueden ser una herramienta importante en la determinación del grado de las lesiones cervicales, especialmente en aquellos casos en los que el diagnóstico histopatológico se torna confuso, brindando diagnósticos mucho más certeros; y en asociación con la determinación del genotipo que está causando la infección se podría enfocar el tratamiento en aquellas pacientes que lo ameriten.

La presente investigación al ser de tipo descriptiva genera una base fundamental para futuros estudios con una población representativa, donde se permita correlacionar la histopatología de las lesiones cervicales, los genotipos del VPH causantes de la infección y marcadores inmunohistoquímicos a partir de biopsias de cuello uterino.

Además, a pesar que los resultados obtenidos no son interpolables a una población específica, surge la idea de realizar nuevos estudios en nuestro país para determinar si genotipos del VPH de alto riesgo diferentes al 16 y 18 circulan de forma importante, para

valorar investigaciones dirigidas a realizar nuevas vacunas que generen protección contra estos genotipos.

Cabe mencionar que dentro de las principales limitaciones que presentó el estudio fue la ausencia de controles positivos, especialmente de muestras con coinfecciones, con lo cual se daría una mayor validez a los resultados obtenidos.

Otro aspecto a señalar, fue el no poder realizar la detección inmunohistoquímica del marcador Ki67 a todas las muestras estudiadas, ello por limitaciones de infraestructura del laboratorio donde se realizaban estos análisis.

9. CONCLUSIONES

La determinación de los genotipos de VPH por medio de una técnica de hibridación reversa puede ser usada como herramienta diagnóstica en biopsias de cuello uterino que presenten displasia cervical.

El genotipo 39 del VPH fue el más frecuente en las 34 biopsias cervicales estudiadas, y un 65% de estas muestras presentó coinfecciones, siendo la asociación más común entre los genotipos de VPH 31, 39, 52 y 58.

La detección del marcador inmunohistoquímico Ki67 permitió determinar las zonas de proliferación celular y confirmar la relación entre la infección por el VPH y la presencia de displasia cervical en las 34 biopsias estudiadas.

10. LITERATURA CONSULTADA

Alameda F, Fusté P, Albert S, Romero E, Gimferrer E, Soler I, *et al.* Citología en medio líquido (Thin Prep Pap Test). Un año de experiencia. *Progresos de Obstetricia y Ginecología*. 2007; 50 (4): 197-202

Beutner K. Human papillomavirus and human disease. *American Journal of Medicine*. 1997; 102: 9-15.

Bosch F, Qiao Y-L, Castellsagué X. The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cáncer. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2006; 94 (1): S8-S21

Boulanger J, Gondry J, Verhoest P. Colposcopia. *Ginecología y Obstetricia*. 2011; 60: 1-14

Burd E. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003; 16 (1): 1-17

Chacón J, Mateos M, Sanz I, Rubio M, Baquero M. Genotipos de virus del papiloma humano más frecuentes en mujeres con citología cervicovaginal alterada utilizando técnicas de captura de híbridos y reacción en cadena de la polimerasa. *Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia*. 2006; 33 (3): 97-101

Dako, 2011. Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-, Code M7240. pp 1-4

Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*. 2005; 32 (1): S7-S15

García T, García E, Gonzáles J, Illueca C, Aznar E, San Juan M, *et al*. Análisis de las coinfecciones mixtas por el virus del papiloma humano (VPH) de alto y bajo riesgo en lesiones de significado incierto. *Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia*. 2013; 1-7.

Gentra® Puregene® Handbook, 3era ed. DNA Purification from FFPE Tissue Using the Gentra Puregene Tissue Kit. 2011. pp 43-44. Tomado de: http://epicore.med.cornell.edu/files/Gentra_Puregene_Handbook.pdf el 09 de julio del 2014 a las 08:45 am

Guittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes*. 2010; 40: 1-13

Hernández M A, Hernández M, Aguilar F, Silveira M, Amigó M, Aguilar K. Tipos de papilomavirus humanos más frecuentes en muestras cubanas de cáncer cervical. *Rev. Cubana Obst. y Ginecol*. 2010; 36 (2): 104-111

Herrel N, Johnson N, Cameron J, Leigh J, Hagensee M. Development and Validation of a HPV-32 Specific PCR Assay. *Virology Journal*. 2009; 6: 90

Herrero R, Hildesheim A, Rodríguez A, Wacholder S, Bratti C, Solomon D, *et al*. Rationale and design of a community-based double-blind randomized clinical trial of an HPV 16 and 18 vaccine in Guanacaste, Costa Rica. *Vaccine*. 2008; 26: 4795-4808

Hildesheim A. Human Papillomavirus Variants: Implications for Natural History Studies and Vaccine Development Efforts. *Journal of the National Cancer Institute*. 1997; 89 (11): 752-753

Hutchinson M, Zahniser D, Sherman M, Herrero R, Alfaro M, Bratti M, *et al*. Utility of Liquid-Based Cytology for Cervical Carcinoma Screening. Results of a Population-Based Study Conducted in a Region of Costa Rica with a High Incidence of Cervical Carcinoma. *Cancer Cytopathology*. 1999; 87: 48-55

Jackson J, Kapur U, MD1, Ersahin C. Utility of p16, Ki-67, and HPV Test in Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Atrophy in Women Older Than 50 Years With 3- to 7-Year Follow-up. *International Journal of Surgical Pathology*. 2012; 20 (2): 146- 153

Kitchener H, Castle P, Cox T. Chapter 7: Achievements and limitations of cervical cytology screening. *Vaccine*. 2006; 24 (S3): 63-70

Kleter B, van Doorn L, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, ter Schegget J, *et al*. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37 (8): 2508-2517

Klimowicz A, Bose P, Nakoneshny S, Dean M, Huang L, Chandarana S, *et al*. Basal Ki67 expression measured by digital image analysis is optimal for prognostication in oral squamous cell carcinoma. *European Journal of Cancer*. 2012; 48: 2166 - 2174

Melo A, Montenegro S, Hooper T, Capurro I, Roa J.C, Roa I. Tipificación del virus papiloma humano (VPH) en lesiones preneoplásicas y carcinoma del cuello uterino en mujeres de la IX Región-Chile. Revista Médica de Chile. 2003; 131: 1382-1390

Ministerio de Salud. Plan Nacional para la Prevención y Control de Cáncer, 2011-2017. Tomado de: http://www.ministeriodesalud.go.cr/gestores_en_salud/consejo_nacional_cancer/DM_plan_nacional_para_la_prevenccion_y_control_del_cancer.pdf el 17 de mayo del 2014 a la 01:51 pm.

Mori S, Nakao S, Kukimoto I, Kusumoto-Matsuo R, Kondo K, Kanda T. Biased amplification of human papillomavirus DNA in specimens containing multiple human papillomavirus types by PCR with consensus primers. Cancer Science. 2011; 102 (6): 1223-1227

Muñoz N, Bosch F, Sanjose S, Herrero R, Castellsague K, Shah K, *et al.* Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. The new england journal of medicine. 2003; 348: 518 – 27

Muñoz N, Castellsagué, Barrington de Gónzales A, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cáncer. Vaccine. 2006; 24 (S3): 3-10

Paavonen J. Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer and related genital neoplasias. International Journal of Infectious Diseases. 2007; 11 (2): 53-59

Pannone G, Rodolico V, Santoro A, Lo Muzio L, Franco R, Botti G, *et al.* Evaluation of a combined triple method to detect causative HPV in oral and oropharyngeal squamous cell

carcinomas: p16 Immunohistochemistry, Consensus PCR HPV-DNA, and In Situ Hybridization. *Infectious Agents and Cancer*. 2012; 7: 1- 4

Pett M, Alazawi W, Roberts I, Dowen S, Smith D, Stanley M, *et al*. Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. *Cancer Research*. 2004; 64: 1359-68.

Raji N, Sadeghizadeh M, Tafreshi K, Jahanzad E. Detection of human Papillomavirus 18 in cervical cancer samples using PCR-ELISA. *Iranian Journal of Microbiology*. 2011; 3 (4): 177-182

Ríos M, Hernández M, Aguilar F, Silveira M, Amigó M, Aguilar K. Tipos de papilomavirus humanos más frecuentes en muestras cubanas de cáncer cervical. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 2010; 36 (2): 104-111

Roland K, MPH; Soman A, Benard V, Saraiya M. Human papillomavirus and Papanicolaou tests screening interval recommendations in the United States. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2011; 447: 1-8

Schiffman M, Liaw K, Herrero R, Sherman M, Hildesheim A. Epidemiologic support for a simplified view of cervical carcinogenesis. *Genital Infections and Neoplasia Update*. 1998; 2-6

Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *International Journal of Cancer*. 2007; 121 (3): 621-32

Stanley M. Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus. *Clinical Microbiology Reviews*. 2012; 25 (2): 215-222

Tena D, Garrido N, Menéndez J, Delgado J, Romanyka J, González M, *et al*. Utilidad de la detección del virus del papiloma humano de alto riesgo mediante Hybrid Capture II® en mujeres con citologías anormales del cuello uterino. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2005; 23 (8): 474-478

van Niekerk W, Dunton C, Richart R, Hilgarth M, Kato H, Kaufman R, *et al*. Colposcopy, Cervicography, Speculoscopy and Endoscopy. *Acta Cytologica*. 1998; 42: 33-49

Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch F, Kummer J, Shah K, *et al*. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology*. 1999; 189: 12-19

Webersinke C, Doppler S, Roithmeier F, Stummvoll W, Silye R. Cervical biopsies and cytological smears - A comparison of sample materials in HPV diagnostics. *Journal of Clinical Virology*. 2013; 56: 69-71

11. ANEXOS

A continuación se adjunta el documento de aprobación extendido por el Comité de Bioética de la Caja Costarricense del Seguro Social, para llevar a cabo dicha investigación, protocolo: CLOBI-HMP-002-2012.



www.cendelsss.sa.cr

Caja Costarricense de Seguro Social
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
TEL (506) 519-3044



CLOBI-HMP-02-12
08 de junio de 2012

Título del proyecto: "Estudio de las Displasias Cervicales en Biopsias Parafinadas del Hospital Dr. Max Peralta Jiménez del año 2009-2011 por PCR Múltiple anidado para Virus de Papiloma Humano e Inmunohistoquímica con los marcadores P53, P16 y Ki-67"	
Número de protocolo asignado: CLOBI-HMP-002-2012	Sesión CLOBI-CCSS: I Fecha: 25 de enero del 2012
Nombre del Investigador principal: Dr. José Luis Quirós Alpizar María José Suárez Sánchez	Grado Académico: Licenciados en Medicina
Lugar de Trabajo: Hospital Dr. Max Peralta	
Dirección:	200 metros Sur de la esquina Suroeste del Parque Central de Cartago.
Teléfono: 8893-5051 / 8844-2106	Correo electrónico: dr.quirós@gmail.com majosu@gmail.com
Facsimile: 2222-1581	Beeper: NA
RESOLUCION TOMADA POR EL CLOBI-CCSS	RECOMENDADO

ANÁLISIS DE LA PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

El Comité Local de Bioética en Investigación (CLOBI-CCSS) revisó, en la sesión ordinaria IV-2012, celebrada el 24 de abril del 2012, la propuesta de investigación mencionada. Al respecto, una vez analizada la documentación correspondiente, el CLOBI-CCSS avala dicha propuesta.

Por lo anterior, y considerando que para que un estudio tenga validez científica debe el protocolo contemplar la descripción de todos los procedimientos que se llevarán a cabo para que sus resultados puedan ser reproducibles, el Comité Local de Bioética en Investigación acuerda, por unanimidad de sus seis (7) miembros presentes, **RECOMENDAR** esta propuesta de investigación. **ACUERDO FIRME** (por consenso).



www.cendeisss.sa.cr

Caja Costarricense de Seguro Social
Centro de Desarrollo Estratégico e Información
en Salud y Seguridad Social
TEL (506) 519-3044



COMITÉ LOCAL DE BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN

MSc. Rafael Matamoros Morales
Vicepresidente



Jeniffer D.

Copia Dr. Eduardo Cambroneró Hernández
Licda. Rosaura Calvo Fernández. Departamento de Estadística
Dr. José Luis Quirós Alpizar / María José Suárez Sánchez
Archivo CLOBI-HMP-II-12