



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETECCIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO
EN CÁNCER EPITELIAL DE OVARIO**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA**

**PRESENTA
EDNA MOLOTLA LÓPEZ**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Profesor: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
VOCAL	Profesor: Dra. María Eugenia Torres Márquez
SECRETARIO	Profesor: Dra. María del Carmen Méndez Herrera
1er SUPLENTE	Profesor: Dr. Efrén Pérez Vázquez
2º SUPLENTE	Profesor: Dr. Luis Tonatiuth Sánchez Linares

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

LABORATORIO DE DESARROLLO GONADAL, EDIFICIO E, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA

DOCTORA EN CIENCIAS MARÍA DEL CARMEN MÉNDEZ HERRERA

SUSTENTANTE

EDNA MOLOTLA LÓPEZ

Este trabajo de investigación se realizó bajo la dirección de la Dra. en Ciencias María del Carmen Méndez Herrera, en el Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina, UNAM.

Un agradecimiento especial a la Dra. Luz Elena Espinoza de los Monteros, por el apoyo académico para la detección del Virus del Papiloma Humano en las muestras de tumores epiteliales de ovario.

Por su valioso apoyo en la realización de este proyecto, un enorme agradecimiento al General Brigadier M. C. Manuel Quirate Medina, director del Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología, SEDENA y a la Coronel M. C. Azucena del Carmen Hernández Martínez, subdirectora de la misma institución.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-DGAPA-PAPIIT) por el financiamiento a través de los proyectos IN224116 e IN224617, así como por la beca otorgada a la estudiante Edna Molotla López para la realización de esta tesis.

Este trabajo forma parte del proyecto aprobado por el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) con número 080340MI y del proyecto aprobado por el Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología Secretaría de la Defensa Nacional con número 123/12.

Al Dr. Enrique Antonio Pedernera Astegiano, Profesor Titular "C" del Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina, UNAM por su invaluable apoyo académico.

A la Dra. Flavia Morales Vásquez y a la Dra. María Delia Pérez Montiel por su asesoramiento académico en el área de Patología Oncológica.

A la QFB. Verónica Rodríguez Mata y a la CD. María José Gómora Herrera, por el apoyo en la realización de las Técnicas Histológicas.

DEDICATORIAS

A mi madre Ana, por haber dedicado tu vida a construir lo que soy, por la manera en que te esfuerzas cada día para continuar hacia el futuro sin importar las circunstancias. Mil gracias.

A mi padre Ignacio, por estar conmigo siempre que lo he necesitado y por todos los sacrificios que has hecho para que no nos falte nada. Gracias.

A mis hermanos, Montse y Said por llenar mi vida de ruido y alegría. Los quiero muchísimo.

A mi amigo Kamui, por tu inquebrantable amistad y tus consejos llenos de sabiduría. Gracias por todo.

A Manuel Aguilar por tu paciencia, tu comprensión y por estar siempre dispuesto a escucharme. Conocerme fue lo mejor que me sucedió durante la Licenciatura. Te quiero.

A Conrado Rosas por recordarme que para alcanzar una meta, lo más importante es la confianza en uno mismo. Gracias amigo.

A Xochitl Talavera por haber confiado en mí desde el primer momento y por brindarme apoyo aún sin solicitártelo. Gracias amiga.

A mis amigos Adrián Mejía, Anabel Ruiz, Eduardo Castañeda, Karla Rangel y Jesica Alvarado, por las risas y los invaluable momentos que hemos compartido, por alegrar mi estancia en la Facultad. Gracias.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	ii
ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS	iii
RESUMEN	v
ANTECEDENTES	1
I. EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)	1
II. EL OVARIO	10
III. CÁNCER DE OVARIO	14
OBJETIVOS	17
HIPÓTESIS	18
METODOLOGÍA	19
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIONES	27
REFERENCIAS	28
ANEXO 1	37
ANEXO 2	39
ANEXO 3	40
ANEXO 4	41
ANEXO 5	42

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No.	CONTENIDO	PÁGINA
1	Genotipos del VPH agrupados con base en los análisis de secuenciación de su ADN, sus diferentes tropismos epiteliales y lesiones asociadas.	2
2	Clasificación de los genotipos del género <i>Alfa</i> con base en su potencial oncogénico.	3
3	Ensamblaje de las proteínas que componen la cápside del VPH.	5
4	La cápside del VPH carece de una envoltura lipídica.	6
5	El genoma del VPH se divide en tres regiones.	6
6	El blanco de una infección por VPH es el epitelio escamoso estratificado.	7
7	La región LCR del genoma del VPH contiene sitios de unión para factores de transcripción celulares.	8
8	Degradación de la proteína p53 por acción de la proteína E6 viral.	8
9	El VPH expresa dos principales oncoproteínas, E6 y E7.	9
10	Papel de la proteína E5 viral.	9
11	El ovario adulto humano.	10
12	Eje hipotálamo-hipófisis-ovario.	11
13	Maduración de los folículos ováricos.	13
14	Grados Histológicos de los carcinomas ováricos asignados por el Comité de Oncología Ginecológica de la FIGO.	15
15	Sistema de clasificación FIGO 2006 para los tumores de ovario.	15
16	Clasificación de las muestras de tejido ovárico empleadas en este estudio para la detección de VPH, de acuerdo al estado hormonal de las pacientes.	22
17	Genotipos de VPH detectados en tejido ovárico.	23

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA NO.	CONTENIDO	PÁGINA
1	Características histológicas de las muestras seleccionadas para la detección de VPH.	21
2	Clasificación de los carcinomas de ovario positivos a VPH.	23

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AR-VPH	Genotipo del Virus del Papiloma Humano de alto riesgo oncogénico
BRAF	Cinasa de la serina/treonina (<i>Serine/Threonine Kinase</i>)
BRCA 1	Cáncer de mama tipo 1 (<i>Breast cancer type 1</i>)
BRCA 2	Cáncer de mama tipo 2 (<i>Breast cancer type 2</i>)
BR-VPH	Genotipo del Virus del Papiloma Humano de bajo riesgo oncogénico
CaCu	Cáncer cervicouterino/cáncer de cérvix
CEO	Cáncer epitelial de ovario
cm	Centímetros
E	Región temprana (<i>Early region</i>)
E6AP	Proteína asociada a E6 (<i>E6-associated protein</i>)
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
FSH	Hormona Foliculoestimulante (<i>Follicle-Stimulating Hormone</i>)
g	Gramos
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina (<i>Gonadotropin-releasing hormone</i>)
HSPG	Heparan sulfato proteoglicano
IARC	Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
KRAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
L	Región Tardía (<i>Late region</i>)
LCR	Región larga de control (<i>Large Control Region</i>)
LH	Hormona luteinizante (<i>Luteinizing Hormone</i>)
Mdm2	<i>Murine double minute 2</i>
p53	Proteína supresora de tumores codificada por el gen humano TP53
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFA	Paraformaldehído
PI3KCA	Fosfatidilinositol-3-cinasa (<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
PTEN	Homólogo de la fosfatasa y la tensina (<i>Phosphatase and tensin homolog</i>)
Rb	Proteína supresora de tumores codificada por el gen humano RB1
TP53	Gen humano que codifica la proteína supresora de tumores p53
Ub	Ubiquitina
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS (CONTINUACIÓN)

VHS	Virus del Herpes Simple
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VPH	Virus del Papiloma Humano

RESUMEN

El contagio con el Virus del Papiloma Humano (VPH) es la infección de transmisión sexual más común a nivel mundial que afecta a hombres y mujeres por igual. Actualmente se han identificado más de 150 genotipos del VPH, clasificados dentro de cinco grupos: *Alfa*, *Beta*, *Gama*, *Mu* y *Nu*. Los virus incluidos dentro del género *Alfa* son los mejor estudiados, ya que se ha detectado ADN de estos genotipos en 99.7% de los casos de cáncer cervicouterino (CaCu) y de otras neoplasias como las de vulva, pene, ano, orofaringe y laringe; por esta razón, se les ha clasificado en función de su potencial oncogénico como de alto riesgo (AR-VPH) o de bajo riesgo (BR-VPH).

La patogénesis del cáncer epitelial de ovario (CEO) aún no ha sido totalmente elucidada, sin embargo, se ha sugerido que el VPH podría estar implicado en el desarrollo de estas neoplasias. Este cáncer es el más letal del tracto reproductor femenino: anualmente, causa la muerte de alrededor de 150 000 mujeres en el mundo y afecta principalmente a pacientes pre-menopáusicas, menopáusicas y post-menopáusicas.

A nivel mundial, el CEO representa aproximadamente 90% de las neoplasias malignas ováricas e incluye distintos subtipos histológicos y grados de malignidad: seroso de alto grado, seroso de bajo grado, endometriode, de células claras y mucinoso.

En México, no se cuenta con información acerca de la presencia del VPH en tejido ovárico, ni en el no tumoral, ni en el maligno; por lo que, este trabajo exploratorio tiene como objetivo la detección y genotipificación del VPH en ovarios no tumorales y en carcinomas ováricos de pacientes mexicanas.

Los resultados muestran la presencia de ADN viral en 2/11 (18.2%) de las muestras de tejido ovárico no tumoral y en 8/28 (28.6%) de los carcinomas. El único genotipo encontrado en el tejido ovárico no tumoral, así como en los carcinomas serosos fue el VPH11, considerado de bajo riesgo oncogénico, mientras que los genotipos VPH43 y VPH89, también considerados de bajo riesgo, fueron detectados en tumores del subtipo endometriode.

Aunque es poco probable que una infección con genotipos de VPH de bajo riesgo oncogénico por sí sola sea el agente causante de la transformación maligna en el epitelio ovárico, se requieren más estudios para conocer si es posible que, asociada a otros factores de riesgo, como una historia familiar de cáncer, infertilidad o tabaquismo pueda contribuir al inicio o la progresión del CEO en las pacientes mexicanas.

ANTECEDENTES

I. EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

El contagio con el Virus del Papiloma humano (VPH) es la infección de transmisión sexual más común a nivel mundial [1] que afecta a hombres y mujeres por igual [2]. Está demostrado que la mayoría de los individuos sexualmente activos la adquirirán en algún momento de su vida [3]. La tasa de contagio del VPH es mayor que la del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y que la del Virus del Herpes Simple tipo 2 (VHS2); se estima que la probabilidad de transmisión del primero es de 40% por acto coital, mientras que la de los dos últimos es de 0.001% por acto coital [4].

Entre los factores de riesgo para adquirir VPH que se han reportado de manera consistente en estudios epidemiológicos, se encuentran aquellos asociados al comportamiento sexual, incluyendo un alto número de parejas sexuales y una edad temprana al momento del primer acto coital [5]. Además del contacto pene-vagina, otras prácticas sexuales como el coito pene-ano o el dedo-vagina y el sexo oral, también son conductas de riesgo para la infección por VPH [6]. Por otra parte, el uso adecuado y constante del condón puede reducir el riesgo de contagio, sin embargo, el virus puede propagarse a través del contacto piel con piel de las superficies que no están cubiertas con el preservativo [7].

Otros factores relacionados con el riesgo de adquirir una infección por VPH incluyen un nivel socioeconómico bajo, el tabaquismo, la multiparidad, una mala alimentación [8,9]; también puede transmitirse durante el parto, desde el cérvix infectado de la madre hasta la mucosa de la orofaringe del recién nacido [10]. El VPH es resistente a temperaturas elevadas y a la sequedad, por lo que cabe la posibilidad de infección a través de vías no sexuales como el intercambio de ropas con personas infectadas [11].

Hasta la fecha, se han identificado más de 150 genotipos del VPH [12], los cuales tienen tropismo por los epitelios escamosos estratificados de la piel (VPH cutáneos) y de la mucosa oral y/o del tracto ano-genital (VPH de la mucosa) [13]. Todos estos genotipos del VPH han sido catalogados, con base en la secuencia de nucleótidos de su ADN genómico y de sus tropismos, dentro de cinco grupos designados con letras del alfabeto griego *Alfa*, *Beta*, *Gama*, *Mu* y *Nu* [14]. Además, se les ha clasificado en función de su potencial oncogénico como de alto riesgo (AR-VPH) o bajo riesgo (BR-VPH) (figura 1) [15].

Los genotipos incluidos dentro del género *Beta*, son considerados como BR-VPH, ya que se les ha asociado con infecciones aparentemente asintomáticas en individuos inmunocompetentes, sin embargo, en individuos inmunosuprimidos, una infección persistente puede conducir al desarrollo de cáncer de piel [16,17].

Los genotipos incluidos dentro de los géneros *Gama*, *Mu* y *Nu*, también han sido clasificados como BR-VPH debido a que pueden causar lesiones cutáneas benignas; sólo ocasionalmente se han encontrado en cánceres de piel [15].

Los virus del papiloma *Alfa* están asociados con infecciones de la mucosa oral y del tracto ano-genital, e incluyen a los genotipos de BR-VPH que pueden causar verrugas benignas en la región ano-genital o en la piel, así como infecciones del sistema respiratorio (figura 1) [18,19]. Sin embargo, el grupo mejor estudiado son los genotipos de AR-VPH del género *Alfa* debido a que han sido claramente vinculados con el desarrollo de carcinomas de las células escamosas y adenocarcinomas del cérvix [20,21], además de otros cánceres del tracto ano-genital como el de vulva, pene y ano además de zonas extra-genitales como laringe y orofaringe [22–26].

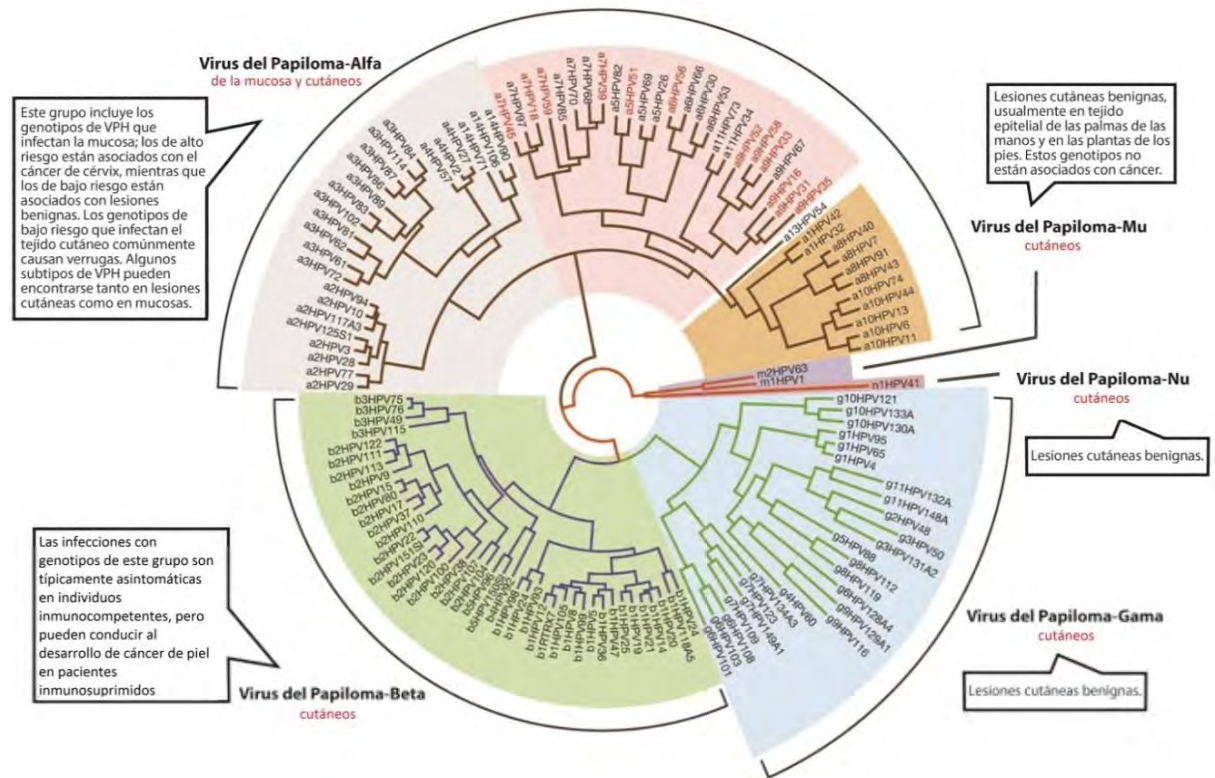


Figura 1. Genotipos del VPH agrupados con base en los análisis de secuenciación de su ADN, sus diferentes tropismos epiteliales y lesiones asociadas. Los genotipos de VPH cutáneos contenidos dentro de los grupos *Alfa* (gris), *Gama* (azul) y *Beta* (verde) generalmente no se asocian con el desarrollo de cáncer, a excepción de algunos virus del género *Beta* involucrados en neoplasias de individuos inmunosuprimidos. Los virus del papiloma *Alfa* (color naranja) causan verrugas genitales; la rama de color rosa corresponde a los genotipos de alto riesgo que están vinculados con las neoplasias cervicales, entre otras [15].

Aunque la mayoría de las infecciones con genotipos AR-VPH comunes entre hombres y mujeres jóvenes sexualmente activos, son eliminadas por una respuesta inmune del individuo, en menos del 10% de los casos, estas infecciones se hacen

persistentes, es decir, el virus permanece en estado latente [5,27], causando inestabilidad genética que, de no tratarse, puede evolucionar a cáncer invasivo [28,29].

Debido a la participación de los distintos genotipos del VPH en la etiología de lesiones malignas, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) ha propuesto categorizar a los genotipos del grupo *Alfa* en función de su potencial oncogénico (figura 2) [30].

Género + Especie	Genotipo	Categoría IARC	Tropismo
Alfa 1	VPH32	3	Mucosa
	VPH42	*	
	VPH3	*	
	VPH10	*	
	VPH28	3	
	VPH29	3	
	VPH77	3	
	VPH94	*	
	VPH117	*	
	VPH125	*	
Alfa 3	VPH61	3	Cutáneo
	VPH62	3	
	VPH72	3	
	VPH81	3	
	VPH83	3	
	VPH84	3	
	VPH86	3	
	VPH87	3	
	VPH89	3	
	VPH102	*	
Alfa 4	VPH114	*	Mucosa
	VPH2	3	
	VPH27	3	
Alfa 5	VPH57	3	Cutáneo
	VPH26	2B	
	VPH51	1	
	VPH69	2B	
Alfa 6	VPH82	2B	Mucosa
	VPH30	2B	
	VPH53	2B	
Alfa 7	VPH56	1	Mucosa
	VPH66	2B	
	VPH18	1	
	VPH39	1	
	VPH45	1	
	VPH59	1	
	VPH68	2A	
	VPH70	2B	
	VPH85	2B	
	VPH97	*	
Alfa 8	VPH7	3	Cutáneo (Mucosa)
	VPH40	3	
	VPH43	*	
Alfa 9	VPH91	3	Mucosa
	VPH16	1	
	VPH31	1	
	VPH33	1	
	VPH35	1	
	VPH52	1	
	VPH58	1	
VPH67	2B		
Alfa 10	VPH6	3	Mucosa
	VPH11	3	
	VPH13	3	
	VPH44	3	
Alfa 11	VPH74	3	Mucosa
	VPH34	*	
Alfa 12	VPH73	*	Mucosa
Alfa 13	VPH54	*	
Alfa 14	VPH71	*	
	VPH90	3	
	VPH106	3	

Figura 2. Clasificación de los genotipos del género *Alfa* con base en su potencial oncogénico [15]:

- 1: Oncogénico
- 2A: Probablemente oncogénico
- 2B: Posiblemente oncogénico
- 3: No oncogénico
- *: Sin clasificar

De acuerdo con los estudios epidemiológicos realizados por la IARC, la distribución de los genotipos oncogénicos del VPH varían en función del grupo étnico y del epitelio en que producen la lesión neoplásica (como el del cérvix, pene, vulva, ano y orofaringe) [31].

El vínculo causal entre la infección por VPH y el desarrollo de lesiones neoplásicas fue demostrado por primera vez en la década de los años 70 por Harald zur Hausen y colaboradores [32], quienes detectaron ADN viral en tejidos de cáncer cervicouterino (CaCu). Los esfuerzos de diversos grupos de investigación han culminado en el desarrollo de vacunas profilácticas efectivas contra el VPH [33].

De los cánceres asociados a la infección por VPH, el CaCu es el que muestra las tasas de incidencia más altas a nivel mundial, es por esta razón que la distribución y la prevalencia de los genotipos virales están reportadas principalmente en pacientes con CaCu. Un estudio publicado en 2013 en Brasil mostró que 99% de las muestras analizadas resultaron positivas a la infección por VPH y que los genotipos que se presentaron con mayor frecuencia fueron 16 (77.6%), 18 (12.3%), 31 (8.8%), 33 (7.1%) y 35 (5.9%) [34]. En Malasia se analizaron 84 muestras identificando a los genotipos de AR-VPH 16 (40%), 18 (3.3%), 31 (0.6%), 33 (1.7%) y el de BR-VPH 87 (0.6%), como los más frecuentes en esa población [35]. Por otro lado, en Arabia Saudita se analizaron 100 pacientes de las cuales 82% resultaron positivas a la infección por VPH; los genotipos hallados con mayor frecuencia fueron 16 (71%), 18, 73, 45 (con 4% cada uno) y 31 (7%) [36].

En México existen trabajos realizados en diferentes regiones geográficas acerca de los genotipos de VPH prevalentes en los casos (CaCu). Uno de ellos se llevó a cabo en la Ciudad de México, y consistió de 462 pacientes de las cuales el 98.7% resultaron positivas para VPH; de ellas, 90.5% presentaron infecciones simples, es decir, con un solo genotipo de VPH y 8.2% presentaron infecciones con más de un genotipo viral (infecciones múltiples). Los genotipos 16 (46.5%), 18 (10.4%), 45 (6.7%) y 31 (4.1%) fueron los más frecuentes en las pacientes con infecciones simples [37].

Un segundo estudio se realizó en el estado de San Luis Potosí, donde 67.7% de las pacientes resultaron positivas a la infección por VPH; 52% de ellas presentó infección simple y el 48%, infecciones múltiples. Los genotipos de AR-VPH prevalentes fueron 33 (33.1%), 16 (16.6%), 18 y 51 (con 6.7% cada uno) [38].

De la literatura es importante resaltar, primero, que la incidencia de la infección con genotipos virales oncogénicos parece ser más alta que aquella con los no oncogénicos y, segundo, que existe prevalencia a nivel mundial del genotipo VPH16 [11]. Por otro lado, se ha encontrado que las infecciones múltiples conducen a la persistencia, la cual es un factor asociado con la progresión a lesiones malignas.

La organización del genoma viral es común para los distintos genotipos del VPH [39] y consiste en un ADN circular cerrado de doble cadena, asociado con proteínas tipo histona y protegido por un armazón proteínico o cápside de geometría icosaédrica formada por dos tipos de proteínas, L1 y L2. La cápside está compuesta por 72 capsómeros; cada capsómero es un pentámero de L1, la proteína principal del armazón. Los pentámeros de L1 se distribuyen para formar una red de enlaces disulfuro intra- e interpentaméricos, lo cual proporciona estabilidad a la estructura [40]. Para ensamblar la cápside, los pentámeros se unen con copias de L2, las cuales ocluyen el centro de cada capsómero pentavalente [41,42]. Por lo tanto, cada virión contiene 360 copias de L1 (72 capsómeros), siendo el componente mayoritario del armazón, y un número variable de copias de L2, dando como resultado una partícula de 50-60 nm de diámetro [43,44]. El ensamblaje de las proteínas que constituyen la cápside del VPH se ilustra de manera esquemática en la figura 3.

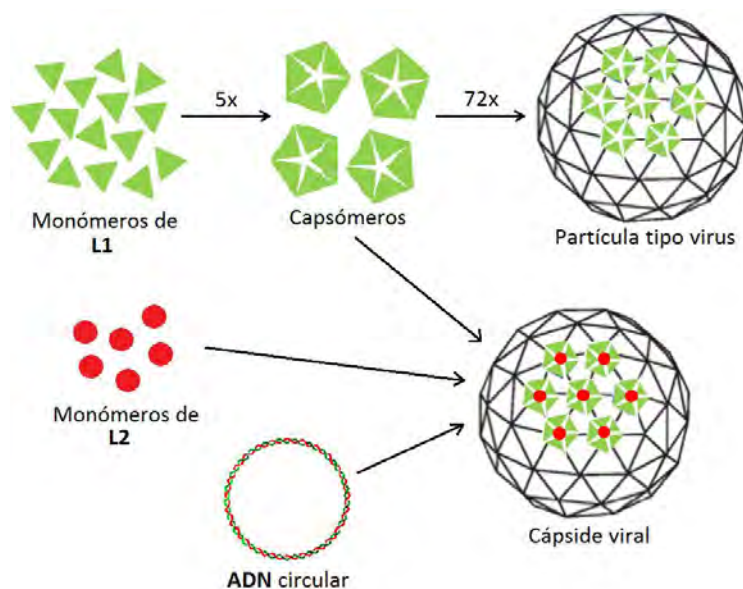


Figura 3. Ensamblaje de las proteínas que componen la cápside del VPH: las unidades de L2 (rojo) ocluyen el centro de los pentámeros de L1 (verde) que están unidos por enlaces disulfuro, proporcionando de este modo estabilidad a la estructura [45].

En algunos tipos de virus, como el VHS2, la cápside está cubierta por una envoltura constituida por fosfolípidos, colesterol, glucoproteínas y glucolípidos, como consecuencia, es posible disolver dicha envoltura mediante el uso de detergentes y, de este modo, inactivar al virus [46,47]. La cápside del VPH carece de esta envoltura lipídica externa, por lo tanto, este virus es resistente ante la presencia de detergentes, condiciones de temperaturas elevadas, valores bajos de pH, y desecación (figura 4) [48].

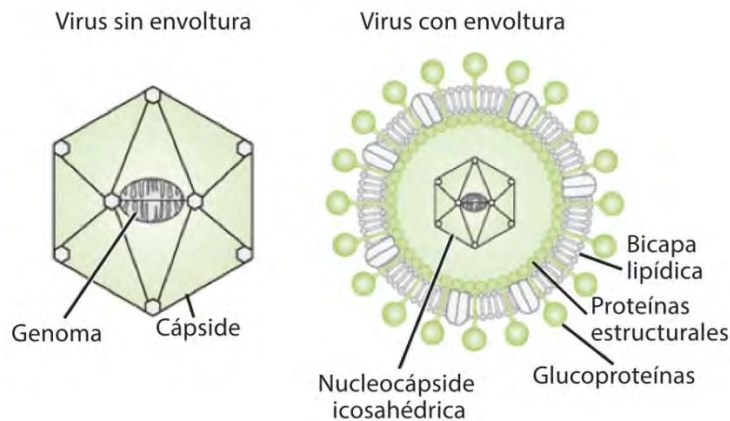


Figura 4. La cápside del VPH carece de una envoltura lipídica, por lo que a diferencia de los virus envueltos, es más resistente a condiciones de temperaturas elevadas y desecación [48].

El genoma del VPH contiene de 6000 a 8000 pares de bases y se divide en tres regiones. La primera es la región larga de control (*Large Control Region, LCR*), la cual cumple con la función reguladora de la transcripción de los genes virales E6 y E7; la segunda es una región temprana (*Early region, E*), que consiste de seis marcos de lectura abiertos (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), los cuales codifican proteínas no estructurales involucradas en la replicación viral y la oncogénesis. La tercera es la región tardía (*Late region, L*), la cual codifica para las proteínas estructurales L1 y L2 [14]. La organización del genoma del VPH puede apreciarse en la figura 5.

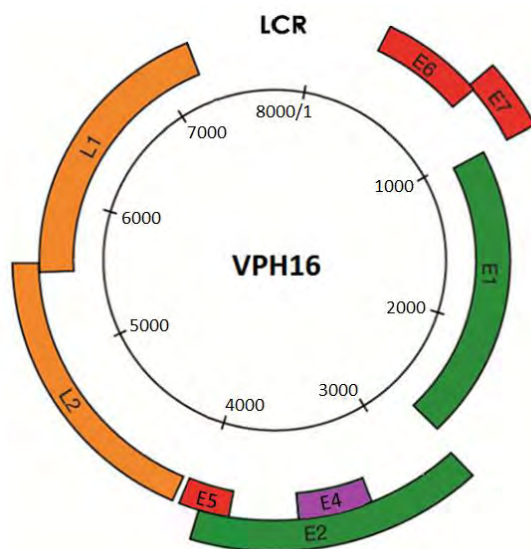


Figura 5. El genoma del VPH se divide en tres regiones: la región larga de control, LCR; la región temprana, E, que contiene los genes que codifican para las proteínas no estructurales E1 a E7; y la región tardía, L, donde se encuentran los genes L1 y L2 que codifican las proteínas estructurales que constituyen la cápside viral [49].

El modelo de infección por VPH ha sido descrito principalmente para la infección del epitelio cervical por genotipos virales de alto riesgo oncogénico [13]. El blanco es el epitelio escamoso estratificado; en este tejido, la célula unida a la membrana basal, es decir, la célula basal o célula madre, es la única con potencial proliferativo: se divide para dar origen a una nueva célula basal y a una célula hija, la cual se desprende de la membrana basal y comienza su proceso de diferenciación, por lo que abandona el ciclo celular y cambia su patrón de expresión

génica para proceder a la diferenciación terminal y, finalmente, a desprenderse del epitelio [50].

Los viriones del VPH infectan las células de la capa basal del epitelio que han quedado expuestas a causa de microlesiones [14]. A pesar de que el receptor para la infección por VPH no ha sido totalmente caracterizado, se ha propuesto el siguiente modelo: inicialmente, los virus se enlazan a los heparan sulfato proteoglicanos (HSPG) localizados sobre la membrana basal y se transfieren hacia el receptor α -integrina, expresado en las células epiteliales que se mueven sobre la membrana basal durante el proceso de cicatrización de la herida, entrando de este modo en las células [51]. Una vez dentro de la célula huésped, el ADN viral se replica conforme las células de la capa basal se diferencian y progresan hacia la superficie del epitelio (figura 6) [43].

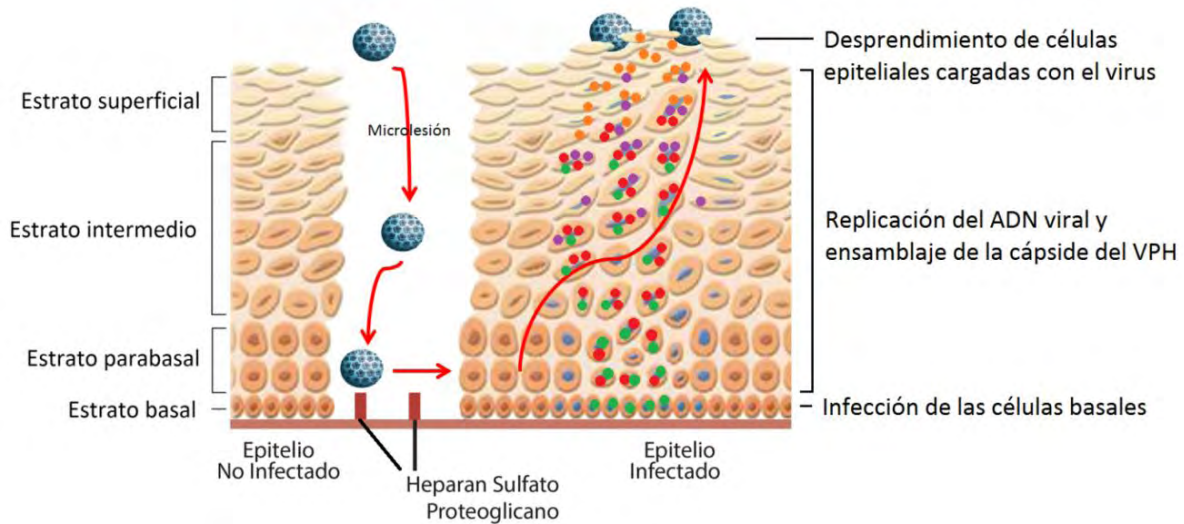


Figura 6. El blanco de una infección por VPH es el epitelio escamoso estratificado. El ciclo de vida del VPH es dependiente del proceso de diferenciación de las células de la capa basal del epitelio [52]. Se ha propuesto que la entrada del VPH en las células sucede a través del HSPG, posteriormente el virus se enlaza al receptor membranar α -integrina. Una vez dentro de la célula, ocurre la replicación del ADN viral y finalmente la liberación de células epiteliales cargadas con el virus; las flechas rojas indican la ruta del VPH, mientras los puntos de colores representan la expresión génica del VPH dentro de las células del tejido epitelial estratificado (verde para E1 y E2; morado para E4; rojo para E5, E6 y E7; naranja para L1 y L2).

Para la replicación del genoma viral se requiere la maquinaria de la célula huésped, ya que los genes virales no codifican ADN polimerasas. En un tejido sano, las células epiteliales que inician el proceso de diferenciación abandonan el ciclo celular, por lo que el VPH necesita reactivar esta división para asegurar que el genoma viral sea replicado [39]. A continuación, se describe la manera en que ocurre la duplicación del ADN del virus y cómo logra reactivar la proliferación de la célula huésped.

El proceso de replicación del ADN viral comienza con la interacción de los factores de transcripción de la célula con la región LCR del virus, siendo E6 y E7 los primeros genes virales en ser transcritos (figura 7) [53].

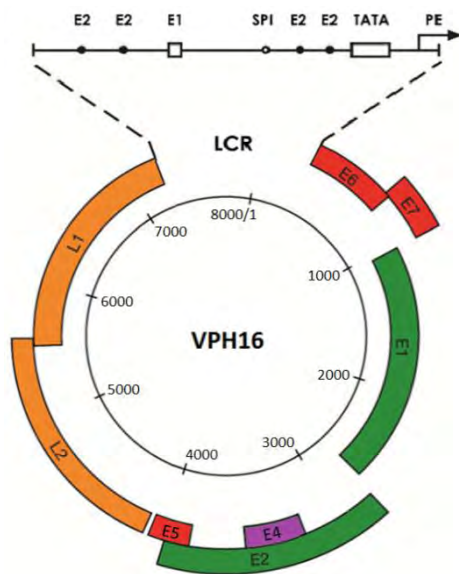


Figura 7. La región LCR del genoma del VPH contiene sitios de unión para factores de transcripción celulares.

La proteína viral E6 se enlaza a una proteína celular denominada *proteína asociada a E6* (E6AP). En una célula infectada por VPH, el complejo proteínico E6AP/E6 se une a una proteína supresora de tumores, p53, promoviendo su poli-ubiquitinación y su subsecuente degradación por el proteosoma (figura 8) [12], mientras que en una célula no infectada es la proteína Mdm2 (por sus siglas en inglés *murine double minute 2*), quien degrada a p53 [54].

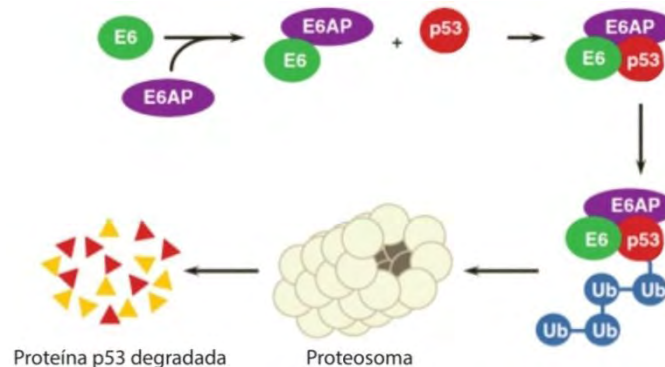


Figura 8. Degradación de la proteína p53 por acción de la proteína E6 viral. La Proteína Asociada a E6 (E6AP, morado) forma un complejo con la proteína viral E6; este se enlaza a p53 (rojo) catalizando así su poli-ubiquitinación (Ub, azul) y posterior degradación por el proteosoma (gris) [12].

Por su parte, la proteína E7 viral se une a la forma hipofosforilada de la proteína retinoblastoma (Rb) [11,53,55], como consecuencia se rompe el complejo formado entre Rb y el factor de transcripción E2F-1. Al quedar libre E2F-1, se enlaza a promotores de genes necesarios para que la célula entre en fase S del ciclo celular y así comenzar su transcripción (figura 9) [53].

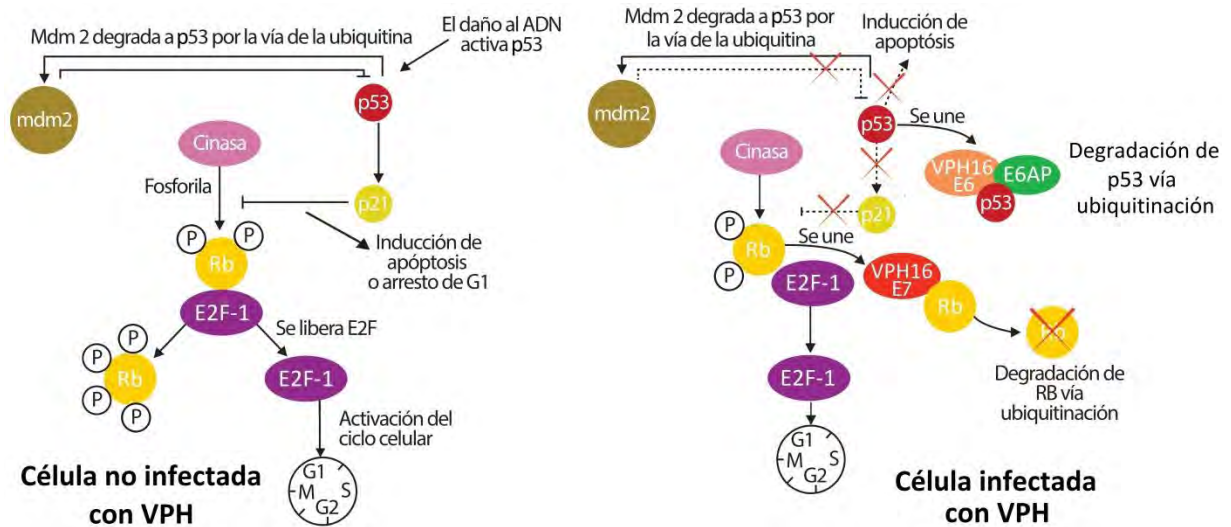


Figura 9. El VPH expresa dos principales oncoproteínas, E6 y E7, las cuales inhiben cooperativamente la apoptosis e incrementan la proliferación de las células tumorales al inducir la degradación del gen supresor de tumores p53 y la disrupción de la función de la proteína del retinoblastoma (Rb), respectivamente [56].

El evento posterior a la acción de las proteínas E6 y E7 es la transcripción de la proteína E5, que induce un incremento en la actividad de proteínas cinasas, principalmente receptores, por lo tanto, la respuesta celular a los factores de crecimiento y de diferenciación se estimulan, lo que resulta en una proliferación continua y diferenciación retardada de la célula huésped (figura 10) [53,57,58].

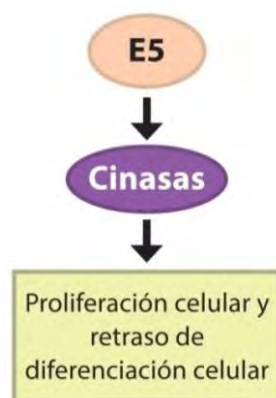


Figura 10. Papel de la proteína E5 viral [13].

El siguiente evento que se presenta es la transcripción de las proteínas E1 y E2; la primera actúa como helicasa, separando las hebras de ADN y permitiendo la unión del complejo de replicación [58]. Mientras tanto, E2 bloquea la transcripción de E6 y E7, permitiendo que E1 se una al origen de replicación del virus [53,55]. Este proceso inicia la replicación del ADN viral, en conjunto con la fase S del ciclo celular. Cuando cesa la transcripción de E6 y E7 por la acción de E2, las proteínas p53 y Rb continúan con su función normal.

Finalmente, se producen las proteínas que forman la cápside viral, L1 y L2, las cuales, con la ayuda de la proteína E4, ensamblan el virión completo, mismo que se libera posteriormente en las capas superiores del epitelio, sin que se presente lisis celular [53,58,59].

La importancia de los genotipos de AR-VPH en el desarrollo de CaCu radica en la alta afinidad de las proteínas E6 y E7 por las proteínas p53 y Rb (respectivamente) de la célula [53], ya que en los BR-VPH esta afinidad es menor, por lo tanto, no se efectúa la unión a p53, o esta es muy débil y no se induce su degradación [54].

Las altas tasas de proliferación celular y la ausencia de apoptosis comienzan a generar inestabilidad genómica en la célula huésped, hecho que conduce al desarrollo de cáncer [53]; el proceso de infección de las células epiteliales por el VPH se muestra resumido en la figura 6.

II. EL OVARIO

El ovario adulto humano es un órgano ovalado con una longitud de 2 a 5 cm en su diámetro mayor; durante la etapa reproductiva, pesa alrededor de 10 g [60] y está constituido por una región cortical externa, rodeada de una capa de tejido fibroso llamado falsa túnica albugínea y que está cubierta por el epitelio germinal. En la corteza se encuentran los ovocitos contenidos dentro de folículos ováricos en diferentes estadios de desarrollo. La médula ovárica está compuesta por tejido conjuntivo laxo con numerosos vasos sanguíneos y nervios asociados [61]. Las regiones del ovario adulto humano descritas en las líneas anteriores y los diferentes estadios de desarrollo de los folículos ováricos se ilustran en la figura 11.

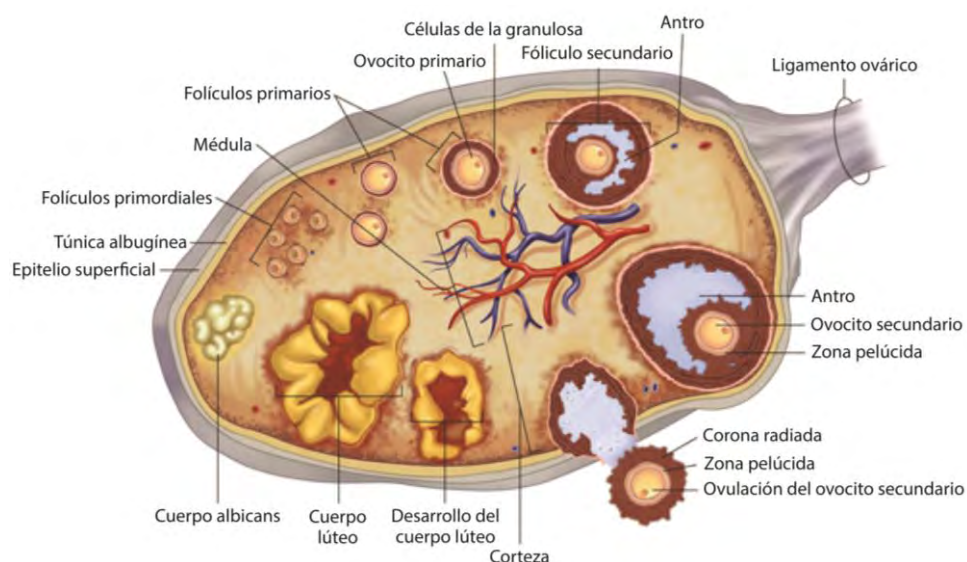


Figura 11. El ovario adulto humano está constituido por una región cortical externa, en la cual se encuentran los folículos ováricos en diferentes estadios de desarrollo, y una región medular, que posee numerosos vasos sanguíneos y nervios [60].

Los folículos ováricos son esenciales para la reproducción. Estos están formados por el ovocito y diversas capas de células de soporte que lo protegen, lo alimentan y le suministran un ambiente hormonal adecuado [62]. Los folículos más pequeños y numerosos son aquellos que se formaron durante la vida fetal (folículos primordiales) [64], los cuales constituyen un almacén de reposo inactivo del que se desarrollan todos los folículos en crecimiento; se localizan en la corteza más externa, por debajo de la falsa túnica albúginea y constan de un ovocito primario, rodeado por una sola capa incompleta de células de la granulosa planas e indiferenciadas (figura 13A) [62].

El folículo primario representa el segundo estadio del desarrollo folicular. Consiste de un ovocito primario rodeado por una sola capa de células de la granulosa cubicas. En esta etapa, se forma una capa acelular que separa al ovocito de las células de la granulosa, denominada zona pelúcida, rica en glucoproteínas secretadas por el ovocito y mucopolisacáridos, producidos por las células de la granulosa (figura 13B) [65].

El folículo secundario contiene múltiples capas de células de la granulosa. Por fuera de la membrana basal, las células del estroma se diferencian, formando la capa de la teca (figura 13C) [62].

El siguiente estadio de desarrollo folicular corresponde a un folículo terciario (antral), el cual contiene aún más capas de células de la granulosa que forman una cavidad llena de líquido folicular, denominada antro. En el folículo antral, las células de la teca se diferencian en dos capas [65]: la teca externa y la teca interna. Esta última capa celular está altamente vascularizada y posee numerosas células cuboidales, dentro de las cuales se lleva a cabo la síntesis de las hormonas esteroideas sexuales que regulan diversas funciones corporales como la ovulación, el embarazo, los cambios emocionales, la memoria y el aprendizaje, entre otras (figura 13D) [66].

El folículo preovulatorio o folículo de De Graaf, representa el estadio final del desarrollo folicular. Durante esta etapa, el líquido folicular llena todo el antro y el ovocito, que alcanza su máximo tamaño, se desplaza hacia una posición excéntrica y se adhiere a la pared folicular. Las células más internas, que rodean al ovocito, se denominan corona radiada, la capa más externa recibe el nombre de *cumulus ooforus* (figura 13E) [62].

El cuerpo lúteo se desarrolla a partir del folículo de De Graaf evacuado en la ovulación.

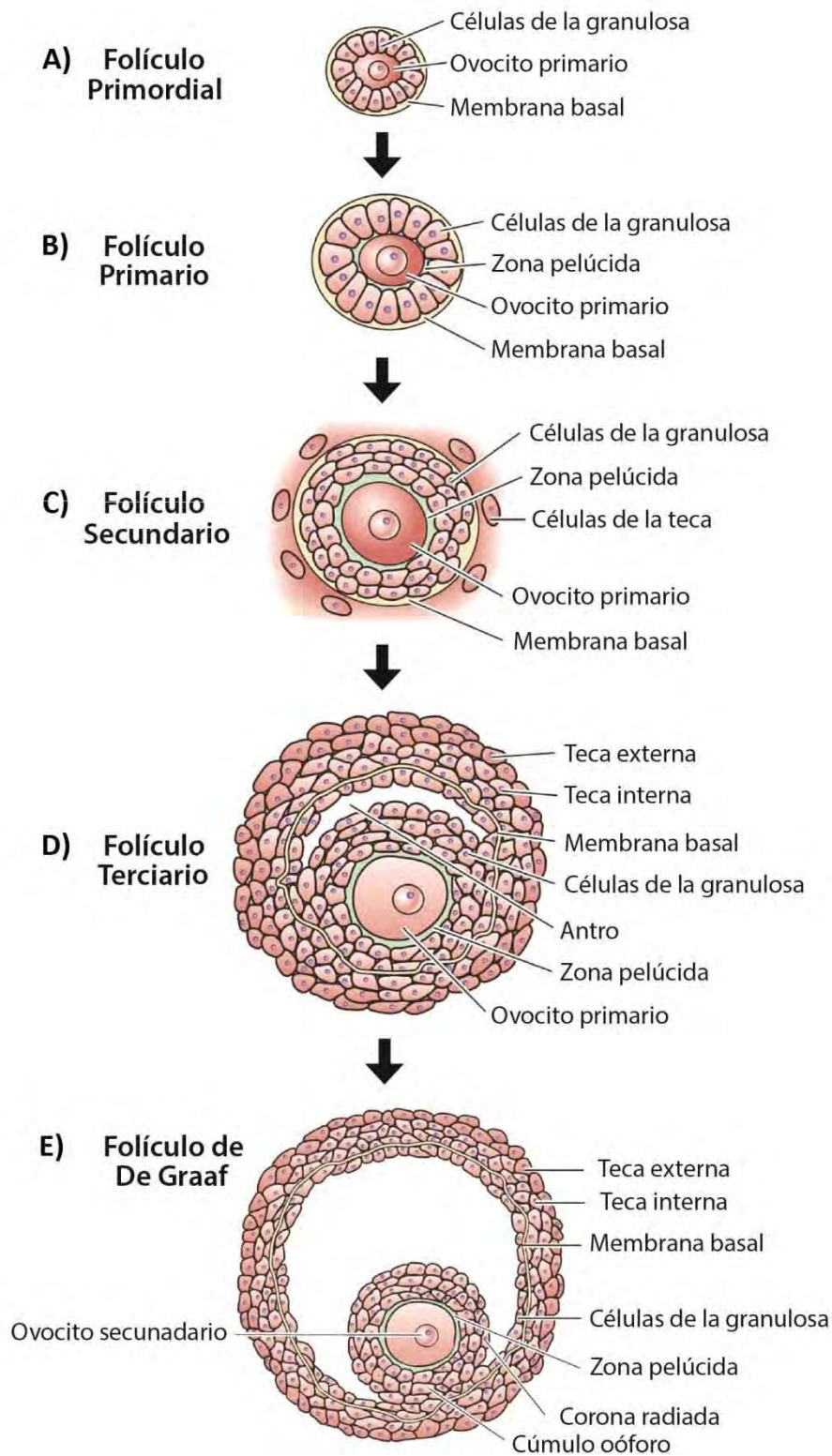


Figura 13. Maduración de los folículos ováricos. Cada una de estas estructuras está constituida por un número variable de capas de células de la granulosa y células de la teca, las cuales presentan alta actividad esteroidogénica [63].

El ovario de una mujer en etapa reproductiva sintetiza y secreta hormonas esteroides sexuales (estrógenos, andrógenos y progestágenos) durante el ciclo sexual. El folículo produce principalmente estradiol y el cuerpo lúteo progesterona.

III. CÁNCER DE OVARIO

El cáncer de ovario es el padecimiento más letal del sistema reproductor femenino: causa la muerte de 150 000 mujeres en todo el mundo cada año [67]. Este cáncer afecta principalmente a grupos de mujeres en las etapas de la peri-menopausia, menopausia y post-menopausia. El porcentaje de incidencias aumenta con la edad. El mal pronóstico de pacientes con cáncer de ovario está asociado con un estadio avanzado de la enfermedad al momento del diagnóstico, debido a que no se presentan síntomas clínicos específicos durante las primeras etapas de la enfermedad y, por lo tanto en la mayoría de los casos (más del 70%), se reconoce el padecimiento en una etapa avanzada [68].

El cáncer de ovario se presenta como una enfermedad compleja y consiste en diferentes tipos de tumores clasificados dentro de dos grupos principales: 1) epiteliales y 2) no epiteliales. Este último grupo incluye el cáncer de las células germinales y el cáncer de los cordones sexuales [69].

El cáncer epitelial ovárico (CEO) es un cáncer heterogéneo que es el más común de los tumores ováricos: a nivel mundial, se presenta en aproximadamente 90% de los casos y engloba distintos subtipos histológicos: seroso (75% de los casos), endometriode (11%), de células claras (11%) y mucinoso (3%) [70].

En México, la distribución de los subtipos histológicos, reportada en 2016 por Morales y colaboradores fue: seroso 55% de los casos, endometriode 19%, mucinoso 8%, de células claras 8% y carcinomas mixtos 10% [71].

Recientemente, Kurman y Shih [72] han sugerido un modelo dualístico que divide a los carcinomas ováricos en dos categorías: Tipo I y Tipo II, basándose en las diferencias moleculares y clínico-patológicas que existen entre los subtipos histológicos. En esta clasificación, los tumores serosos de alto grado son de Tipo II y el resto de los subtipos histológicos son de Tipo I. Los tumores Tipo II son biológicamente más agresivos que los de Tipo I. Los tumores de Tipo I poseen mutaciones en los genes KRAS, BRAF, PI3KCA y PTEN. Los tumores de Tipo II se caracterizan por mutaciones en los genes BRCA1 o BRCA2 y TP53 [73].

Un grupo diferente es el de los carcinomas de bajo potencial maligno (limítrofes), cuya biología en la mayoría de los casos, se asemeja a la de las lesiones benignas, sin embargo, en el 20% de los casos se presenta una lesión más allá de los ovarios. Este tipo de tumores representan del 15-20% de todos los carcinomas ováricos y fueron clasificados como un grupo separado de los tumores epiteliales por la Organización Mundial de la Salud en 1973 [68]. Su principal característica es

la ausencia de invasión estromal destructiva, con una actividad mitótica y una atipia moderadas, además de un aumento excesivo de células epiteliales [74,75].

De acuerdo con el sistema de estadificación establecido en 2006 por el Comité de Oncología Ginecológica de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO), los carcinomas de ovario se clasifican además en función de su grado de malignidad (grado histológico) (figura 14) [76].

Categoría		Grado de malignidad
GX	El grado no puede ser evaluado	No aplica
G1	Bien diferenciado	Bajo
G2	Moderadamente diferenciado	Alto
G3	Pobremente diferenciado	Alto

Figura 14. Grados Histológicos de los carcinomas ováricos asignados por el Comité de Oncología Ginecológica de la FIGO con base en el grado de malignidad de la neoplasia [76].

De este modo, los tumores G1 están designados como de bajo grado de malignidad, mientras que los G2 y G3 corresponden a tumores de alto grado. Esta clasificación sólo se aplica en el caso de los tumores epiteliales [77].

Por otra parte, los tumores también se estadifican de acuerdo con el nivel de diseminación que presenta la enfermedad al momento del diagnóstico (figura 15).

Etapa FIGO	Descripción
I	Crecimiento limitado a los ovarios
IA	Un ovario
IB	Ambos ovarios
IC	Neoplasia en estado IA o IB, pero con tumor en la superficie de uno o ambos ovarios
II	Crecimiento limitado a la pelvis
IIA	Metástasis hacia las tubas uterinas y/o el útero
IIB	Metástasis hacia otras estructuras pélvicas como el colon o la vejiga
IIC	Neoplasia en estado IIA o IIB pero con presencia de ascitis
III	Crecimiento limitado al abdomen
IIIA	Metástasis microscópica (implantes < 2 cm) hacia el peritoneo
IIIB	Metástasis macroscópica (implantes > 2 cm) hacia el peritoneo
IIIC	Metástasis hacia los nodos linfáticos
IV	El cáncer se ha extendido hasta órganos extrapélvicos como el hígado o los pulmones

Figura 15. Sistema de clasificación FIGO 2006 para los tumores de ovario de acuerdo con el nivel de diseminación de la enfermedad al momento del diagnóstico [76].

Sin embargo, en 2014 se realizaron algunas modificaciones a este sistema de clasificación, de modo que los grados de malignidad que se muestran en la figura 14, se emplean ahora para los subtipos endometriode, de células claras y mucinoso, mientras que los carcinomas serosos, se designan como de alto o bajo grado histológico [78]. Estas modificaciones se toman en cuenta para la clasificación de las muestras incluidas en el presente estudio.

La etiología del cáncer epitelial de ovario aún no se comprende totalmente, sin embargo, se ha sugerido que están involucrados factores genéticos, reproductivos y hormonales. Mutaciones en los genes BRCA1 o BRCA2, una historia familiar de cáncer de ovario y nuliparidad, son factores asociados con el incremento del riesgo de padecer CEO [79–81]. En contraste, existen reportes de que el uso de anticonceptivos orales y la ligación de las tubas uterinas disminuyen el riesgo de CEO [80,82]. Se ha sugerido que el VPH podría estar implicado en el desarrollo del CEO, debido a que se ha detectado ADN de este virus en muestras de CaCu, y de otras neoplasias, incluyendo las de vulva, vagina, ano, pene, orofaringe y laringe, entre otras.

Hasta el momento, se desconocen las rutas de entrada del VPH al ovario [83]. Algunos autores sugieren que asciende desde el tracto genital inferior hasta la gónada [84], por esta razón, se han realizado estudios que buscan detectar el ADN viral en tejido ovárico tanto no tumoral como tumoral, con el objetivo de determinar si el VPH desempeña un papel importante en el desarrollo de las neoplasias ováricas. A continuación, se describen algunos de estos estudios.

El grupo de investigación de Wu y colaboradores, en 2003 [85], buscó el genotipo VPH16 en 50 carcinomas de ovario de los cuales 52% resultaron positivos. Además se analizaron 30 ovarios no tumorales donde se observó que 6.7% también fueron positivas a dicho genotipo viral. Los resultados de esta publicación sugieren que la prevalencia de la infección con VPH16 es más alta en los tumores epiteliales en comparación con los ovarios no tumorales, lo que da lugar a la especulación acerca de la participación del virus en el desarrollo del CEO.

En Turquía, el grupo de Atalay y colaboradores [86], llevó a cabo un análisis que incluyó 94 pacientes, de las cuales, 76/94 tuvieron diagnóstico clínico-patológico confirmado de carcinoma ovárico del subtipo seroso. Se detectó VPH en 8/76 (10.5%) de las pacientes: seis de ellas presentaron el genotipo VPH16 y las dos restantes, el genotipo VPH33. Ninguna de las pacientes mostró infección múltiple.

En México no se cuenta con información acerca de la presencia de VPH en tejido ovárico, ni normal, ni maligno, por lo que este trabajo exploratorio tiene como objetivo la detección de la infección y la genotipificación del VPH en ovarios no tumorales y en carcinomas ováricos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Detectar la presencia de ADN del Virus del Papiloma Humano en carcinomas ováricos de pacientes mexicanas y realizar la genotipificación en las muestras que resulten positivas a esta infección, comparando los resultados con muestras de ovarios no tumorales.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar 58 muestras quirúrgicas de pacientes mexicanas con diagnóstico confirmado de carcinoma de ovario primario y que cumplan con los criterios de inclusión establecidos.
2. Discriminar las muestras quirúrgicas obtenidas en función de su tipo histológico y grado de malignidad.
3. Obtener el ADN genómico de las estructuras epiteliales de las muestras mencionadas.
4. Realizar la genotipificación de los virus con la técnica de PCR mediante la plataforma tecnológica CLART (Clinical Array Technology) que identifica 35 genotipos virales.

HIPÓTESIS

Será posible detectar genotipos del Virus del Papiloma Humano tanto de alto riesgo como de bajo riesgo oncogénico en carcinomas de ovario de pacientes mexicanas.

METODOLOGÍA

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y del Instituto Nacional de Cancerología (INCan).

Las muestras de ovarios no tumorales (n = 18) se obtuvieron de pacientes con diagnóstico de CaCu o carcinoma de endometrio, que fueron extirpados como parte del tratamiento médico indicado.

Las muestras quirúrgicas de tumores del epitelio ovárico (n = 40), fueron obtenidas de pacientes que ingresaron al INCan, diagnosticadas con cáncer epitelial de ovario primario entre los años 2008-2014, y que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

1. Diagnóstico anatómo-patológico confirmado de cáncer epitelial de ovario de los subtipos histológicos seroso y endometrioide.
2. Consentimiento Informado firmado (ver Anexo 1).
3. Sin tratamiento quirúrgico previo ni quimioterapia.
4. Información de la historia clínica disponible.

En todos los casos se mantuvo el anonimato de las pacientes, cumpliendo con las normas éticas establecidas para los bancos de tumores internacionales, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

La recolección de las muestras se realizó durante el transoperatorio de las pacientes que se sometieron a un proceso quirúrgico. Enseguida, se fijó la muestra en paraformaldehído 4% (PFA) en buffer de fosfatos, y se procedió con la técnica histológica ordinaria hasta su inclusión en parafina (ver Anexo 2).

Se realizaron cortes histológicos de 3 μm y se tiñeron con hematoxilina-eosina (ver Anexo 3) para identificar un área representativa del tumor y de este modo, ubicar la zona en el bloque de parafina y extraerla mediante el uso de un *sacabocados*. Cabe mencionar que para cada muestra se utilizó material nuevo desechable para evitar la contaminación entre los diferentes tejidos. Posteriormente, se extrajo el ADN genómico mediante el *PureLink Genomic DNA Mini Kit (INVITROGEN K1820-01)*, siguiendo el protocolo del proveedor (ver Anexo 4).

Una vez obtenido el ADN se verificó la integridad, concentración y pureza del mismo. De las muestras cuyas condiciones de ADN fueron óptimas, se amplificó un fragmento de 450pb de la región L1 del genoma del VPH, mediante una PCR punto final.

Los productos amplificados de la PCR se visualizaron mediante la electroforesis en un gel de agarosa al 2% utilizando como revelador bromuro de etidio, para observar la presencia del amplicón correspondiente a 450pb del VPH.

A las muestras que resultaron positivas a la infección por VPH, se les realizó la genotipificación mediante la plataforma tecnológica *CLART HPV2 (Clinical ArrayTechnology Human Papillomavirus 2, GENOMICA)* la cual consiste en un microarreglo de 35 genotipos de VPH (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 y 89) a través de la hibridación de zonas específicas del microarreglo con el producto amplificado marcado con biotina, que al entrar en contacto con estreptoavidina-peroxidasa, genera un producto insoluble que se visualiza a través de un lector CAR (*Clinical Array Reader, GENOMICA*) (ver Anexo 5).

RESULTADOS

En total se analizaron 58 muestras quirúrgicas: 18 correspondieron a ovarios no tumorales y las restantes, a tejidos tumorales. En los ovarios no tumorales se seleccionaron estructuras epiteliales, mientras que los cortes provenientes de los carcinomas se observaron al microscopio para confirmar que pertenecía a tejido tumoral sólido y al diagnóstico anatómo-patológico reportado en la respectiva historia clínica. Todas las muestras cumplieron con los criterios de inclusión descritos previamente.

Los tejidos tumorales fueron clasificados por subtipo histológico, resultando en 35 tumores serosos de los cuales 19 fueron de alto grado, 5 de bajo grado, 10 limítrofes y 1 tumor con grado histológico indeterminado. De los carcinomas endometrioides (n = 5) todos fueron moderadamente diferenciado (G2) de acuerdo al sistema FIGO 2014.

Del total de muestras analizadas, 39 presentaron un ADN con las condiciones de integridad, concentración y pureza requeridas para llevar a cabo la detección y genotipificación de los 35 tipos virales de VPH mediante la plataforma *CLART HPV2 (GENOMICA)*. De estas, 11 correspondieron a tejidos no tumorales y las 28 restantes fueron carcinomas del subtipo seroso (n = 23) y endometrioide (n = 5). En la tabla 1 se muestra el grado histológico de los tumores que fueron seleccionados para este estudio.

Tabla 1. Características histológicas de las muestras seleccionadas para la detección de VPH.

Tejido ovárico	Subtipo histológico	Grado histológico**	Número de muestras, n = 39
No tumoral	(n = 11)		11
Tumoral	Seroso (n = 23)	Alto grado	12/23
		Bajo grado	4/23
		Limítrofe	6/23
		Desconocido	1/23
	Endometrioide (n = 5)	Moderadamente diferenciado (G2)	5

**FIGO 2014

La edad promedio de las pacientes cuyos tejidos ováricos se seleccionaron (n = 39) fue de 47.9 años. Al catalogar las muestras en no tumorales y tumorales, la edad promedio de las pacientes fue 50.9 años en el caso de los tejidos no tumorales, mientras que para los tumorales fue de 46.8 años.

La clasificación de las pacientes por su estado hormonal fue de 35.9% (n = 14) en la pre-menopausia; 25.6% (n = 10) en menopausia y 25.6% (n = 10) en post-menopausia. Del 12.8% (n = 5) restante, no se tuvo información (figura 16).

Se observó que de las muestras de ovarios no tumorales, 27.3% correspondieron a mujeres pre-menopáusicas y 72.7% a pacientes post-menopáusicas. En cuanto a los ovarios tumorales, 39.3% fueron de pacientes pre-menopáusicas; 39.3% menopáusicas; 7.1% post-menopáusicas y de 14.3% de los casos carecieron de datos acerca del estado reproductivo de la paciente (figura 16).

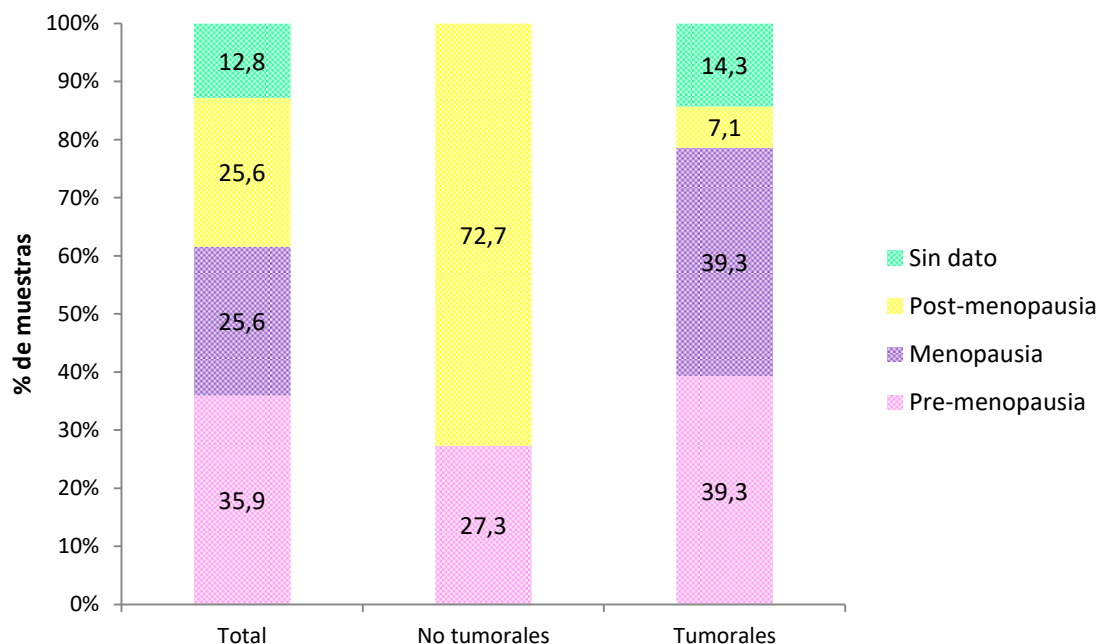


Figura 16. Clasificación de las muestras de tejido ovárico empleadas en este estudio para la detección de VPH, de acuerdo al estado hormonal de las pacientes.

La detección del ADN viral en las muestras se realizó mediante una PCR punto final. Resultaron positivos 10/39 tejidos, los cuales se sometieron a genotipificación. De los ovarios no tumorales, 2/11 (18.2%) fueron positivos y el genotipo VPH11 estuvo presente en el 100% de las muestras infectadas. En el caso de los carcinomas, 8/28 (28.6%) resultaron positivos para VPH: 6/8 fueron del subtipo seroso y nuevamente el genotipo VPH11 se manifestó en el 100% de estas muestras. El resto de los tejidos tumorales infectados (2/8) correspondieron a carcinomas del subtipo endometriode, donde una de las muestras presentó el genotipo VPH43 y la otra el VPH89 (figura 17).

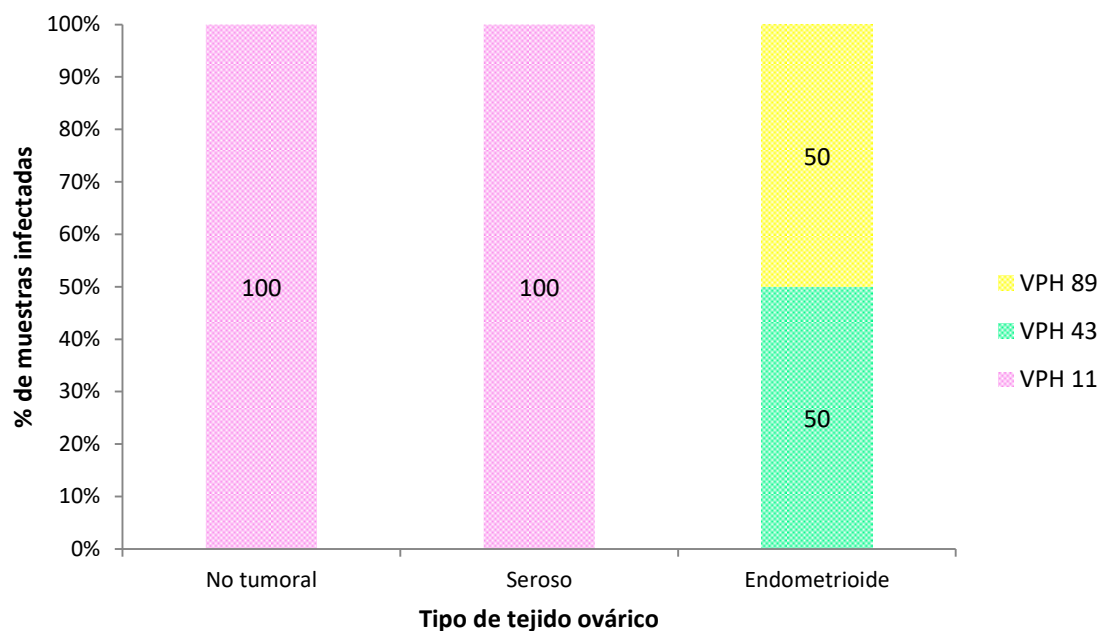


Figura 17. Genotipos de VPH detectados en tejido ovárico. Resalta la presencia del VPH11 tanto en el total de muestras tejido no tumoral, como en los carcinomas del subtipo seroso.

Dado que las muestras analizadas correspondían a ovarios de pacientes del INCa, los patólogos usaron el sistema de clasificación FIGO 2006 para asignar el estadio de los tumores al momento del diagnóstico. De este modo, de los carcinomas positivos a la infección por VPH, dos se encontraban en estadio IA al momento del diagnóstico; uno en estadio IC; uno en estadio IIA; uno en estadio IIC; dos en estadio IIIC y uno más en estadio IV (tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de los carcinomas de ovario positivos a VPH.

Subtipo histológico	Grado histológico**	Estadio FIGO*	Genotipo de VPH
Seroso (n = 6)	Alto grado	IIA	11
	Alto grado	IIC	11
	Alto grado	IIIC	11
	Alto grado	IV	11
	Bajo grado	IA	11
	Bajo grado	IIIC	11
Endometrioid (n = 2)	Moderadamente diferenciado (G2)	IA	89
	Moderadamente diferenciado (G2)	IC	43

*FIGO 2006 y **2014

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo muestran que el Virus del Papiloma Humano (VPH) es capaz de infectar el ovario y los carcinomas derivados del mismo. En este estudio se eligió trabajar con la plataforma tecnológica *CLART HPV2 (Clinical Array Technology Human Papillomavirus 2, GENOMICA)* por su alta sensibilidad para la detección del ADN viral e identificación de 35 genotipos específicos de alto y bajo riesgo oncogénico.

El genotipo viral VPH11 fue el único encontrado en las muestras de ovarios no tumorales y en los carcinomas serosos de ovario. Este virus está clasificado como de bajo riesgo oncogénico para el epitelio del cérvix, sin embargo, en los epitelios escamosos de la cavidad oral y de la laringe, se ha reportado capaz de inducir la formación de tumores malignos [87,88]. Otros estudios lo relacionan con el desarrollo de carcinomas penianos y de neoplasias intraepiteliales anales [89–91]. En la literatura destaca el reporte de un paciente que a los 2 años de edad padeció papilomatosis respiratoria recurrente juvenil, vinculada a la infección por VPH11; el mismo individuo falleció a los 19 años de edad, cuando ya había desarrollado carcinomas de células escamosas en los pulmones y en el corazón, estos asociados a la infección por VPH11 [92].

La infección por VPH se ha detectado en carcinomas de mama [93–95] incluyendo a la población mexicana donde se encontró ADN viral en 15/51 (29.4%) muestras analizadas [96]. Específicamente para el VPH11, Pereira y colaboradores [97] mostraron que estaba presente en 16/61 (26%) carcinomas mamarios de pacientes argentinas. Nótese la similitud que existe entre los resultados del grupo de Pereira y los obtenidos en este trabajo, pues si bien los tumores malignos, tanto de mama como de ovario, tienen una etiología compleja, que no se explicaría sólo por la infección con VPH, tampoco puede descartarse que ésta participe en la carcinogénesis de dichos tejidos.

Por otro lado, el genotipo VPH89 se detectó en uno de los dos los carcinomas endometrioides que resultaron infectados (2/5, 40%). Al igual que el VPH11, el VPH89 también está clasificado como de bajo riesgo oncogénico para el epitelio del cérvix, sin embargo, Datta y colaboradores [98] reportaron la presencia de VPH89 en muestras de cérvix de mujeres hindúes, haciendo énfasis en que este genotipo infecta de manera persistente al epitelio cervical, por lo que puede considerarse que la infección con VPH89 podría ascender a la parte superior del tracto reproductor femenino y llegar hasta el ovario. Se requiere tener más información para saber si el VPH89 está involucrado en el desarrollo de las neoplasias ováricas.

En el segundo carcinoma endometriode infectado, se detectó el genotipo VPH43, clasificado como de bajo riesgo oncogénico para el epitelio del cérvix. A pesar de que hasta donde se ha revisado la literatura no existen trabajos que reporten la

presencia del VPH43 en algún tipo de carcinoma, Li y su grupo de investigación [99] , lo reportaron como genotipo prevalente en mujeres de Shanxi, China, pues estuvo presente en 38.13% (151/396) de las muestras de tejido cervical que analizaron.

Otro estudio realizado por Wang y colaboradores [100] en el cual, durante 5 años, se estudiaron los cambios que ocurrieron en el tejido cervical infectado con VPH de mujeres de Shenzhen, China, se reportó una tasa de prevalencia para el VPH43 de 1.36%, cifra que se mantuvo aproximadamente constante durante el periodo de estudio, sugiriendo que al igual que en el caso del VPH89, una infección con VPH43 podría estar asociada con la persistencia en el tejido cervical, ascendiendo posteriormente al tracto superior femenino e infectando el ovario, contribuyendo así al desarrollo de lesiones malignas en este tejido.

Las infecciones por VPH en el tracto genital son más frecuentes en mujeres jóvenes [5], sin embargo, en este estudio se detectó ADN viral en un carcinoma seroso de alto grado en una mujer de 90 años, lo cual sugiere que la infección puede permanecer latente dentro de las células epiteliales del ovario durante varios años.

En la literatura no se dispone de información suficiente para determinar si la infección por VPH en el ovario y los carcinomas derivados de éste son eventos aislados sin relevancia clínica, o bien, si la infección asociada con otros factores de riesgo puede contribuir de alguna manera a la malignización del tejido y participar en la progresión de los carcinomas.

Por una parte están los trabajos que han buscado intencionadamente genotipos virales de alto riesgo como VPH16, 18 y 33 en carcinomas de ovario [85,101–106], obteniendo resultados contradictorios: Lai y su equipo de investigación [101], identificaron los genotipos de alto riesgo VPH16 y 18 en carcinomas ováricos, siendo la infección con VPH16 la más frecuentemente encontrada en estas neoplasias; sin embargo, el número de muestras es bajo y no permite sacar conclusiones definitivas.

En contraste con estos resultados, otros grupos de investigación no lograron detectar ADN viral en carcinomas ováricos, tal es el caso de Chen y colaboradores [102], quienes buscaron intencionadamente los genotipos VPH16 y 18 en 20 muestras de carcinomas ováricos, pero ninguna mostró la presencia de ADN del VPH. Anttila y su grupo de investigación [107] ampliaron tanto el número de muestras como el espectro de búsqueda al incluir genotipos de alto y bajo riesgo oncogénico pero a pesar de ello, no encontraron ADN viral en las muestras que analizaron (98 carcinomas ováricos). Estas contradicciones podrían ser atribuidas a la precisión de la técnica utilizada en los estudios y al hecho de que la prevalencia de los genotipos virales varía en función de las poblaciones estudiadas [108,109].

Aunque es poco probable que por sí sola, una infección con genotipos de VPH de bajo riesgo oncogénico sea el agente causante de la transformación maligna en el epitelio ovárico, se requieren más estudios para saber si es posible que, asociada a otros factores de riesgo, como una historia familiar de cáncer, infertilidad o tabaquismo, pueda contribuir al inicio o la progresión del CEO en las pacientes mexicanas.

Aun cuando el número de muestras que se analizaron en este estudio fue bajo y no pueden, por tanto, generalizarse los resultados obtenidos, si puede concluirse que los carcinomas serosos pueden estar infectados por VPH y se destaca la presencia del genotipo de VPH11, mismo que fue encontrado también en los ovarios no tumorales.

CONCLUSIONES

El Virus del Papiloma Humano es capaz de infectar el tejido ovárico. Los genotipos virales encontrados en ambos tipos de tejido ovárico fueron VPH11, 43 y 89, todos considerados de bajo riesgo oncogénico. Siendo VPH11 el genotipo prevalente tanto en las muestras no tumorales como en los carcinomas.

Aunque la detección ADN del VPH no necesariamente implica una relación causal entre la infección por este virus y el desarrollo de carcinomas ováricos, los resultados mostrados en este trabajo evidencian la necesidad de estudios más detallados acerca de los factores que pudieran asociarse a la infección por VPH y que están implicados en el desarrollo de carcinomas ováricos de pacientes mexicanas.

REFERENCIAS

1. Smith JS, Melendy A, Rana RK, Pimenta JM. Age-specific prevalence of infection with human papillomavirus in females: a global review. *J. Adolesc. Health.* 2008;43:S5-25.
2. Boiron L, Joura E, Largeron N, Prager B, Uhart M. Estimating the cost-effectiveness profile of a universal vaccination programme with a nine-valent HPV vaccine in Austria. *BMC Infect. Dis.* 2016;16:1–15.
3. Al Moustafa AE, Al-Awadhi R, Missaoui N, Adam I, Durusoy R, Ghabreau L, et al. Human papillomaviruses-related cancers Presence and prevention strategies in the Middle East and North African Regions. *Hum. Vaccines Immunother.* 2014;10:1812–21.
4. Burchell AN, Richardson H, Mahmud SM, Trottier H, Tellier PP, Hanley J, et al. Modeling the sexual transmissibility of human papillomavirus infection using stochastic computer simulation and empirical data from a cohort study of young women in Montreal, Canada. *Am. J. Epidemiol.* 2006;163:534–43.
5. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N. Engl. J. Med.* 1998;338:423–8.
6. Hernandez BY, Wilkens LR, Zhu X, Thompson P, McDuffie K, Shvetsov YB, et al. Transmission of human papillomavirus in heterosexual couples. *Emerg. Infect. Dis.* 2008;14:888–94.
7. Barnack-Tavlaris JL, Serpico JR, Ahluwalia M, Ports KA. “I have human papillomavirus”: An analysis of illness narratives from the Experience Project. *Appl. Nurs. Res.* 2016;30:137–41.
8. Cotton SC, Sharp L, Seth R, Masson LF, Little J, Cruickshank ME, et al. Lifestyle and socio-demographic factors associated with high-risk HPV infection in UK women. *Br. J. Cancer.* 2007;97:133–9.
9. Giuliano AR, Siegel EM, Roe DJ, Ferreira S, Baggio ML, Galan L, et al. Dietary intake and risk of persistent human papillomavirus (HPV) infection: the Ludwig-McGill HPV Natural History Study. *J. Infect. Dis.* 2003;188:1508–16.
10. Tseng C. Perinatal Transmission of Human Papillomavirus in Infants: Relationship Between Infection Rate and Mode of Delivery. *Obstet. Gynecol.* 1998;91:92–6.
11. Ault KA. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2006;2006:1–5.
12. Gagnon D, Archambault J. A High-Throughput Cellular Assay to Quantify the

p53-Degradation Activity of E6 from Different Human Papillomavirus Types. In: Keppler D, Lin AW, editors. *Cerv. Cancer Methods Protoc.* 1st ed. New York: Humana Press; 2015. p. 111–20.

13. Silva R, León D, Brebi P, Ili C, Roa JC, Sánchez R. Detection of human papilloma virus infection in men. *Rev. Chilena Infectol.* 2013;30:186–92.

14. Fernandes J. Biology and natural history of human papillomavirus infection. *Open Access J. Clin. Trials.* 2013;5:1–12.

15. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine.* 2012;30:F55–70.

16. Nindl I, Gottschling M, Stockfleth E. Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer: basic virology and clinical manifestations. *Dis. Markers.* 2007;23:247–59.

17. Ekström J, Forslund O, Dillner J. Three novel papillomaviruses (HPV109, HPV112 and HPV114) and their presence in cutaneous and mucosal samples. *Virology.* 2010;397:331–6.

18. Crow JM. HPV: The global burden. *Nature.* 2012;488:S2–3.

19. Lacey CJN, Lowndes CM, Shah K V. Chapter 4: Burden and management of non-cancerous HPV-related conditions: HPV-6/11 disease. *Vaccine.* 2006;24:S35–41.

20. Williams NL, Werner TL, Jarboe EA, Gaffney DK. Adenocarcinoma of the Cervix: Should We Treat It Differently? *Curr. Oncol. Rep.* 2015;17:1–10.

21. Plante M. Evolution in fertility-preserving options for early-stage cervical cancer: radical trachelectomy, simple trachelectomy, neoadjuvant chemotherapy. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 2013;23:982–9.

22. Loizou C, Laurell G, Lindquist D, Öfverman C, Stefansson K, Nylander K, et al. Incidence of tonsillar cancer in northern Sweden: Impact of human papilloma virus. *Oncol. Lett.* 2015;10:3565–72.

23. Zhang Y, Koneva LA, Virani S, Arthur AE, Virani A, Hall PB, et al. Subtypes of HPV-positive head and neck cancers are associated with HPV characteristics, copy number alterations, PIK3CA mutation, and pathway signatures. *Clin. Cancer Res.* 2016;22:4735–45.

24. Cancer IA for R on. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Monograph. 2007;89:223–76.

25. Partridge JM, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection in men. *Lancet Infect Dis.* 2006;6:21–31.

26. De Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, et al. Global

burden of cancers attributable to infections in 2008: A review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* 2012;13:607–15.

27. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am. J. Med.* 1997;102:3–8.

28. Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish a S, Chang CJ, Palan P, et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995;87:1365–71.

29. Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000;92:464–74.

30. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K V, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003;348:518–27.

31. Forman D, De Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, et al. Global Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases. *Vaccine.* 2012;30:F12–23.

32. de Villiers EM, Gissmann L, zur Hausen H. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J. Virol.* 1981;40:932–5.

33. Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2013;382:889–99.

34. de Oliveira CM, Fregnani JHTG, Carvalho JP, Longatto-Filho A, Levi JE. Human papillomavirus genotypes distribution in 175 invasive cervical cancer cases from Brazil. *BMC Cancer.* 2013;13:357–64.

35. Chong PP, Asyikin N, Rusinahayati M, Halimatun S, Rozita R, Ng CK, et al. High prevalence of human papillomavirus DNA detected in cervical swabs from women in Southern Selangor, Malaysia. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 2010;11:1645–51.

36. Alsbeih G, Al-Harbi N, El-Sebaie M, Al-Badawi I. HPV prevalence and genetic predisposition to cervical cancer in Saudi Arabia. *Infect. Agent. Cancer.* 2013;8:1–8.

37. Guardado-Estrada M, Juárez-Torres E, Román-Bassaure E, Medina-Martinez I, Alfaro A, Benuto RE, et al. The distribution of high-risk human papillomaviruses is different in young and old patients with cervical cancer. *PLoS One.* 2014;9:1–12.

38. DelaRosa-Martínez R, Sánchez-Garza M, López-Revilla R. HPV genotype distribution and anomalous association of HPV33 to cervical neoplastic lesions in San Luis Potosí, Mexico. *Infect. Agent. Cancer.* 2016;11:1–10.

39. Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, Sakai H. Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. *Front.*

Microbiol. 2012;3:1–12.

40. Sapp M, Volpers C, Müller M, Streeck RE. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 1995;76:2407–12.

41. Buck CB, Cheng N, Thompson CD, Lowy DR, Steven AC, Schiller JT, et al. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J. Virol.* 2008;82:5190–7.

42. Conway MJ, Meyers C. Replication and assembly of human papillomaviruses. *J. Dent. Res.* 2009;88:307–17.

43. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004;68:362–72.

44. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology.* 2009;384:260–5.

45. Schiller JT, Müller M. Next generation prophylactic human papillomavirus vaccines. *Lancet Oncol.* 2015;16:e217–e225.

46. Wang F, Kieff E. Medical Virology. In: Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Loscalzo J, editors. *Harrison's Princ. Intern. Med.* 19th ed. New York: McGraw-Hill; 2015. p. 1174–89.

47. Sydiskis RJ, Owen DG, Lohr JL, Rosler KHA, Blomster RN. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991;35:2463–6.

48. Rosenthal KS, Tan MJ. Viral Structure, Classification, and Replication. In: Rosenthal KS, Tan MJ, editors. *Rapid Rev. Microbiol. Immunol.* 3rd ed. Philadelphia: Elsevier; 2011. p. 112–20.

49. Hiller T, Iftner T. The human papillomavirus. In: Prendiville W, Davies P, editors. *Heal. Prof. HPV Handbook, 1 Hum. Papillomavirus Cerv. Cancer.* 1st ed. London: The European Consortium for Cervical Cancer Education. Taylor & Francis Group; 2004. p. 11–8.

50. Jones PH, Simons BD, Watt FM. Sic Transit Gloria: Farewell to the Epidermal Transit Amplifying Cell? *Cell Stem Cell.* 2007;1:371–81.

51. Kines RC, Thompson CD, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009;106:20458–63.

52. Lowy DR, Schiller JT. Review series Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J. Clin. Invest.* 2006;116:1167–73.

53. Burd E. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16:1–17.

54. López-Saavedra A, Lizano-Soberón M. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Unidad Investig. Biomédica en Cáncer. UNAM - INCan.* 2006;1:31–55.
55. Janicek MF, Averette HE. Cervical cancer: prevention, diagnosis, and therapeutics. *CA. Cancer J. Clin.* 2001;51:92–114.
56. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat. Rev. Cancer.* 2010;10:550–60.
57. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer.* 2002;2:342–50.
58. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, Maruo T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci.* 2004;50:9–19.
59. Jung W-W, Chun T, Sul D, Hwang KW, Kang H-S, Lee DJ, et al. Strategies against human papillomavirus infection and cervical cancer. *J. Microbiol.* 2004;42:255–66.
60. Hoffman BL, Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Bradshaw KD, Cunningham F, et al. Reproductive Endocrinology. In: Hoffman BL, Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Bradshaw KD, Cunningham F, et al., editors. *Williams Gynecol.* 3rd ed. New York: McGraw-Hill; 2016. p. 345–60.
61. Rebar RW, Erickson GF. Ovarios y desarrollo. In: Goldman L, Schafer AI, editors. *Cecil y Goldman. Tratado Med. Interna.* 24th ed. Barcelona: Elsevier; 2013. p. 1533–8.
62. Considine R V. Aparato reproductor femenino. In: Rhoades RA, Bell DR, editors. *Fisiol. Médica. Fundam. Med. Clínica.* 4th ed. Barcelona: Lippincott Williams & Wilkins; 2012. p. 698–720.
63. Mesiano S, Jones EE. The Female Reproductive System. In: Boron WF, Boulpaep EL, editors. *Med. Physiol.* 3rd ed. Philadelphia: Elsevier; 2017. p. 1108–1128.e1.
64. Mescher AL. The Female Reproductive System. In: Mescher AL, editor. *Junqueira's Basic Histol.* 14th ed. New York: McGraw-Hill; 2016. p. 476–90.
65. Paulsen DF. Female Reproductive System. In: Paulsen DF, editor. *Histol. Cell Biol. Exam. Board Rev.* 5th ed. New York: McGraw-Hill; 2010. p. 215–33.
66. Pudney JA. Overall View of the Organization of the Vertebrate Gonad and the Structure of Steroidogenic Cells. In: Chester-Jones I, Ingleton PM, Phillips JG, editors. *Fundam. Comp. Vertebr. Endocrinol.* 1st ed. New York: Springer US; 1987. p. 57–94.
67. Vernooij F, Heintz P, Witteveen E, van der Graaf Y. The outcomes of ovarian

cancer treatment are better when provided by gynecologic oncologists and in specialized hospitals: A systematic review. *Gynecol. Oncol.* 2007;105:801–12.

68. Kotowicz B, Fuksiewicz M, Sobiczewski P, Spiewankiewicz B, Jonska-Gmyrek J, Skrzypczak M, et al. Clinical value of human epididymis protein 4 and the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm in differentiating borderline pelvic tumors from epithelial ovarian cancer in early stages. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2015;194:141–6.

69. Williams ARW. Pathological assessment of ovarian cancer. *Methods Mol. Med.* 2001;39:49–60.

70. Köbel M, Reuss A, Du Bois A, Kommoss S, Kommoss F, Gao D, et al. The biological and clinical value of p53 expression in pelvic high-grade serous carcinomas. *J. Pathol.* 2010;222:191–8.

71. Morales-Vásquez F, Pedernera E, Reynaga-Obregón J, López-Basave HN, José Gómora M, Carlón E, et al. High levels of pretreatment CA125 are associated to improved survival in high grade serous ovarian carcinoma. *J. Ovarian Res.* 2016;9:1–6.

72. Kurman R, Shih I. The Origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer-a proposed unifying theory. *Am. J. Surg. Pathol.* 2010;34:433–43.

73. Groen RS, Gershenson DM, Fader AN. Updates and emerging therapies for rare epithelial ovarian cancers: One size no longer fits all. *Gynecol. Oncol.* 2015;136:373–83.

74. Lalwani N, Shanbhogue AKP, Vikram R, Nagar A, Jagirdar J, Prasad SR. Current update on borderline ovarian neoplasms. *Am. J. Roentgenol.* 2010;194:330–6.

75. Böcker W. WHO classification of breast tumors and tumors of the female genital organs: pathology and genetics. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* 2002;86:116–9.

76. Berek JS, Crum C, Friedlander M. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 2012;119:S118–29.

77. Bodurka DC, Deavers MT, Tian C, Sun CC, Malpica A, Coleman RL, et al. Reclassification of serous ovarian carcinoma by a 2-tier system: A Gynecologic Oncology Group study. *Cancer.* 2012;118:3087–94.

78. Berek JS, Crum C, Friedlander M. Cáncer of the ovary, fallopian tube and peritoneum. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 2015;131:S111–22.

79. Granström C, Sundquist J, Hemminki K. Population attributable fractions for ovarian cancer in Swedish women by morphological type. *Br. J. Cancer.* 2008;98:199–205.

80. Riman T, Nilsson S, Persson IR. Review of epidemiological evidence for

reproductive and hormonal factors in relation to the risk of epithelial ovarian malignancies. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2004;83:783–95.

81. Soegaard M, Jensen A, Høgdall E, Christensen L, Høgdall C, Blaakær J, et al. Different risk factor profiles for mucinous and nonmucinous ovarian cancer: Results from the Danish MALOVA study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2007;16:1160–6.

82. Ness RB, Grisso JA, Cottreau C, Klapper J, Wheeler JE, Morgan M, et al. Factors Related to Inflammation of the Ovarian Epithelium and Risk of Ovarian Cancer. *Epidemiology.* 2000;11:111–7.

83. Svahn MF, Faber MT, Christensen J, Norrild B, Kjaer SK. Prevalence of human papillomavirus in epithelial ovarian cancer tissue. A meta-analysis of observational studies. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2014;93:6–19.

84. Yang H-J, Liu VWS, Tsang PCK, Yip AMW, Ng T-Y, Cheung ANY, et al. Comparison of human papillomavirus DNA levels in gynecological cancers: implication for cancer development. *Tumour Biol.* 2003;24:310–6.

85. Wu Q-J, Guo M, Lu Z-M, Li T, Qiao H-Z, Ke Y. Detection of human papillomavirus-16 in ovarian malignancy. *Br. J. Cancer.* 2003;89:672–5.

86. Atalay F, Taskiran C, Taner MZ, Pak I, Or M, Tuncer S. Detection of human papillomavirus DNA and genotyping in patients with epithelial ovarian carcinoma. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2007;33:823–8.

87. Zhao D, Xu Q, Chen X, Fan M. Human papillomavirus as an independent predictor in oral squamous cell cancer. *Int. J. Oral Sci.* 2009;1:119–25.

88. Taberna M, Resteghini C, Swanson B, Pickard RKL, Jiang B, Xiao W, et al. Low etiologic fraction for human papillomavirus in larynx squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2016;61:55–61.

89. Lebelo RL, Thys S, Benoy I, Depuydt CE, Bogers J-P, Bida MN, et al. Laser micro-dissection and qPCR for identifying specific HPV types responsible for malignancy in penile lesions. *J. Med. Virol.* 2015;87:1761–8.

90. Li X, Li M, Yang Y, Zhong X, Feng B, Xin H, et al. Anal HPV/HIV co-infection among Men Who Have Sex with Men: a cross-sectional survey from three cities in China. *Sci. Rep.* 2016;6:1–9.

91. Palefsky JM, Giuliano AR, Goldstone S, Moreira ED, Aranda C, Jessen H, et al. HPV vaccine against anal HPV infection and anal intraepithelial neoplasia. *N. Engl. J. Med.* 2011;365:1576–85.

92. Mauz P-S, Zago M, Kurth R, Pawlita M, Holderried M, Thiericke J, et al. A case of recurrent respiratory papillomatosis with malignant transformation, HPV11 DNAemia, high L1 antibody titre and a fatal papillary endocardial lesion. *Virol. J.* 2014;11:114–9.

93. Manzouri L, Salehi R, Shariatpanahi S, Rezaie P. Prevalence of human papilloma virus among women with breast cancer since 2005-2009 in Isfahan. *Adv. Biomed. Res.* 2014;3:75–9.
94. Bae J-M, Kim EH. Human papillomavirus infection and risk of breast cancer: a meta-analysis of case-control studies. *Infect. Agent. Cancer.* 2016;11:14–21.
95. Li J, Ding J, Zhai K. Detection of human papillomavirus DNA in patients with breast tumor in China. *PLoS One.* 2015;10:1–10.
96. de León DC, Montiel DP, Nemcova J, Mykyskova I, Turcios E, Villavicencio V, et al. Human papillomavirus (HPV) in breast tumors: prevalence in a group of Mexican patients. *BMC Cancer.* 2009;9:26–31.
97. Pereira Suarez AL, Lorenzetti MA, Gonzalez Lucano R, Cohen M, Gass H, Vazquez PM, et al. Presence of Human Papilloma Virus in a Series of Breast Carcinoma from Argentina. *PLoS One.* 2013;8:2–5.
98. Datta P, Bhatla N, Pandey RM, Dar L, Patro a R, Vasisht S, et al. Type-specific incidence and persistence of HPV infection among young women: a prospective study in North India. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2012;13:1019–24.
99. Li J, Wang Y, Tian X, Wang P, Nan X, Yan T, et al. Analysis of human papillomavirus infection and typing in Shanxi province. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 2014;48:192–6.
100. Wang Y-Y, Li L, Wei S, Peng J, Yuan S-X, Xie J-S, et al. Human Papillomavirus (HPV) infection in women participating in cervical cancer screening from 2006 to 2010 in Shenzhen City, South China. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14:7483–7.
101. Lai C, Wang C, Lin C, Pao C. Detection of human papillomavirus RNA in ovarian and endometrial carcinomas by reverse transcription/polymerase chain reaction. *Gynecol Obs. Invest.* 1994;38:276–80.
102. Chen TR, Chan PJ, Ph D, Seraj IM, King A. Absence of Human Papillomavirus E6 – E7 Transforming Genes from HPV 16 and 18 in Malignant Ovarian Carcinoma. 1999;182:180–2.
103. Ip SM, Wong LC, Xu CM, Cheung AN, Tsang PC, Ngan HYS. Detection of Human Papillomavirus DNA in Malignant Lesions from Chinese Women with Carcinomas of the Upper Genital Tract. *Gynecol Oncol.* 2002;87:104–11.
104. Quirk JT, Kupinski JM, DiCioccio RA. Analysis of ovarian tumors for the presence of human papillomavirus DNA. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2006;32:202–5.
105. Bilyk OO, Pande NT, Pejovic T, Buchinska LG. The frequency of human papilloma virus types 16, 18 in upper genital tract of women at high risk of developing ovarian cancer. *Exp. Oncol.* 2014;36:121–4.

106. Chiang A-J, Chen D-R, Cheng J-T, Chang T-H. Detection of human papillomavirus in squamous cell carcinoma arising from dermoid cysts. Taiwan. J. Obstet. Gynecol. 2015;54:559–66.
107. Anttila M, Syrja S. Failure to Demonstrate Human Papillomavirus DNA in Epithelial Ovarian Cancer by General Primer PCR. Gynecol. Oncol. 1999;72:337–41.
108. Husain RSA, Ramakrishnan V. Global Variation of Human Papillomavirus Genotypes and Selected Genes Involved in Cervical Malignancies. Ann. Glob. Heal. 2015;81:675–83.
109. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: Comparison by geographic region and with cervical cancer. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2005;14:1157–64.

ANEXO 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Determinación de receptores hormonales y GPR 30 en pacientes con sospecha de cáncer de Ovario en el Instituto Nacional de Cancerología.

JUSTIFICACION

A través de este conducto la invitamos a participar en un estudio de investigación. Los médicos del Instituto Nacional de Cancerología estamos interesados en conocer [la expresión de los receptores hormonales en tejido tumoral](#) de cáncer epitelial de ovario y la relación de [dicho estado](#) con el tratamiento recibido y la evolución de la enfermedad.

PROPOSITO

El cáncer de ovario es un tumor maligno que está asociada con una importante resistencia a los tratamientos sistémicos por lo que es necesario investigar y conocer mejor el comportamiento de las células de este tipo de tumor.

Nuestro propósito es identificar [la expresión de receptores hormonales en estas células tumorales y la relación que pueda tener la expresión de estos marcadores moleculares con la respuesta a los diferentes tratamientos que usted pueda recibir, a fin de conocer mejor el comportamiento de su tumor.](#)

Para ello será necesario tomar una pequeña muestra en fresco y al menos un bloque de tumor conservado en parafina, del tumor que le sea quitado al momento de la cirugía laparotomía exploradora y citoreductora con que los médicos cirujanos iniciarán el tratamiento de su enfermedad.

RIESGOS

Usted no tendrá ningún riesgo al participar con nosotros ya que únicamente se tomarán [las muestras y el procedimiento no tiene riesgo](#) ni implica ninguna manipulación adicional al tratamiento que de por sí debería recibir.

Asimismo, al inicio del estudio, se le realizará una entrevista para llenar un cuestionario con datos sociodemográfico, antecedentes ginecológicos y obstétricos, uso de anticonceptivos hormonales, hábitos y costumbres.

Finalmente, también se revisará su expediente de manera rutinaria a fin de llevar el control de sus tratamientos y conocer su evolución.

BENEFICIOS

Los tratamientos que se utilicen serán asignados o establecidos por los médicos del servicio de Gineco-Oncología y Oncología Médica, de acuerdo con la evolución de su padecimiento.

El costo de las tomas adicionales de tumor o sangre corre a cargo de los médicos investigadores.

TX ALTERNATIVOS

En caso de que no aceptar participar en el estudio usted tendrá los mismos derechos que los pacientes que acuden al Instituto, es decir recibirá la atención y los tratamientos correspondientes de acuerdo a las características de su enfermedad, sin que su negativa signifique o represente alguna represalia en contra de usted. Además como en todo paciente del Instituto gestionaremos todos los apoyos posibles para evitar que abandone su tratamiento.

PARTICIPACION VOLUNTARIA

Tomar parte en este estudio de investigación es su decisión. Usted no tiene que participar en el estudio si no lo desea. En caso de que usted decida participar, también le hacemos saber que está en libertad de abandonarlo en momento que usted lo decida sin tener que dar explicaciones. Su cuidado médico no se verá afectado en ningún momento si decide no participar en el estudio o abandonarlo en algún momento. Al aceptar participar en este estudio usted se compromete a asistir a sus consultas en las fechas señaladas, si usted se cambia de lugar dónde vive o no regresa a la clínica, se le llamará para averiguar donde se encuentra y poder seguir teniendo contacto con usted.

INDEMNIZACION

No recibirá remuneración alguna por su participación, tampoco habrá indemnización de ningún tipo ya que **el proyecto no implica algún tipo de riesgo para usted**, los gastos derivados del tratamiento deberán ser cubiertos por usted.

CONFIDENCIALIDAD

Los resultados que se obtengan del estudio realizado y de la información que usted nos proporcione solo será manejada por el grupo de investigadores, usted será identificada por un código y número de paciente en el estudio. Usted no será identificada en ningún reporte o publicación resultante de este estudio.

EN CASO DE DUDA

Usted podrá hablar con la Dra. Flavia Morales-Vásquez 56 28 04 00 ext 429.

Dra. Carmen Méndez 56 28.04.00 ext 429

El Dr. Juan Zinser Sierra. Presidente del Comité de Ética 56 28 04 00 ext 125

Con base en la información presentada **ACEPTO VOLUNTARIAMENTE** participar en el estudio **“Determinación de los Receptores de estrógeno, progesterona y GPR-30 en cáncer epitelial del ovario y su asociación con la respuesta al tratamiento”**

Nombre, apellidos del participante _____		
Dirección _____		
Teléfono _____		
Fecha _____	Firma _____	
Nombre, apellidos del investigador Flavia Morales-Vásquez Carmen Méndez-Herrera Dirección San Fernando No 22 col Toriello Guerra, Del. Tlalpan Teléfono 56.28.04.00 ext 429. Fecha _____		Firma _____

Nombre, apellidos testigo 1 _____	
Dirección _____	
Teléfono _____	
Fecha _____	Firma _____

ANEXO 2

PROTOCOLO DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE TEJIDOS PARA HISTOLOGÍA INCLUSIÓN EN PARAFINA

El tejido procedente del transoperatorio, se fijó con paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos (añadiendo 15 mL de fijador por cada gramo de tejido), durante 24 h. Posteriormente, se lavó la muestra con PBS; 5 lavados de 20 minutos cada uno. Enseguida se procedió con la deshidratación del tejido, utilizando una serie de disoluciones de etanol de concentración ascendente: la muestra se sumergió durante 1h en cada disolución, en el siguiente orden: 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, etanol absoluto 1, etanol absoluto 2, xilol 1 y xilol 2.

Una vez deshidratado el tejido, se incluyó en parafina 1 a 56 °C durante 1h. A continuación, se incluyó en parafina 2 durante 1 h. Para realizar esta última inclusión, se colocó la muestra en un molde metálico que ayudó a colocar el tejido en un casete de plástico. Se dejaron enfriar los moldes sobre una base fría durante 30 minutos con la finalidad de poder retirar el molde y obtener el casete que contiene el tejido incluido en parafina. Los bloques de parafina resultantes, se etiquetaron con el número de muestra y el número de expediente y de este modo se almacenaron a 4 °C.

ANEXO 3

PROTOCOLO DE TINCIONES HEMATOXILINA/EOSINA

De cada bloque de parafina se hizo un corte de 3 μm de grosor, mediante el uso de un micrótopo. Posteriormente, se extendió y se adhirió el corte en un portaobjetos (laminilla).

Para poder llevar acabo la tinción hematoxilina/eosina, fue necesario desparafinar cada uno de los cortes, por lo cual se acomodaron las laminillas en una canastilla de portaobjetos y esta se introdujo a una estufa durante 2 horas a 56 °C.

Una vez transcurridos los 30 minutos dentro de la estufa, se sacó la canastilla y se transfirió a un vaso coplin para hacerle tres lavados con xilol de 10 minutos cada uno, para eliminar el exceso de parafina de los cortes.

Enseguida, se procedió con la hidratación de los tejidos utilizando una serie de disoluciones de etanol de concentración descendente: se sumergió la canastilla durante 10 minutos en cada disolución, en el siguiente orden: etanol absoluto, etanol al 96%, 80% y 50%. Luego, se lavó con agua corriente durante 5 minutos.

Posteriormente, se introdujeron las laminillas en hematoxilina de Hill (previamente filtrada) durante 5 minutos y al cabo de ese tiempo, se lavaron nuevamente con agua corriente durante 5 minutos. Enseguida se realizó un baño de agua amoniacal para neutralizar la hematoxilina de las laminillas y nuevamente se lavaron con agua corriente durante unos segundos.

Con un microscopio electrónico, se observaron los cortes para determinar si la tinción de los núcleos celulares era óptima; en caso de no serlo, se sumergió la laminilla una vez más en la hematoxilina. Una vez que la tinción fue óptima, se retiró el exceso de colorante con agua corriente y posteriormente se colocó la canastilla dentro un vaso coplin lleno de agua destilada y se mantuvo ahí durante 5 minutos.

Al cabo de ese tiempo, las laminillas se introdujeron en un vaso coplin que contenía eosina al 0.2% durante 2 minutos y luego se lavaron con agua corriente, pero esta vez, sólo durante unos segundos, para evitar que la tinción desapareciera.

A continuación, se procedió con la deshidratación de los tejidos ya teñidos, para lo cual, se sumergieron las laminillas una serie de disoluciones de etanol de concentración ascendente: 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, etanol absoluto 1, etanol absoluto 2, xilol 1 y xilol 2.

De nuevo, se observaron los cortes en el microscopio para verificar que la tinción fuera óptima; en caso de no serlo, se sumergió la laminilla una vez más en la eosina. Una vez que se obtuvo la tinción óptima, se colocaron unas gotas de resina en uno de los bordes del corte y de este modo, adherir un cubreobjetos evitando la formación de burbujas de aire entre el tejido y el cubreobjetos.

Al final de este proceso, cuando la tinción fue óptima, al observar los cortes en el microscopio, pudieron apreciarse los núcleos de las células de los tejidos en color morado y los citoplasmas en color naranja muy tenue.

ANEXO 4

PureLink® Genomic DNA Kits Para la purificación de ADN genómico

Números de Catálogo K1820-01, K1820-02, K1821-04
Número de Documento 25-1012
Número de Publicación MAN0000601
Revisión 2.0

Procedimiento para usuarios del Mini Kit experimentados

Introducción Esta guía rápida de referencia está incluida para usuarios experimentados del PureLink® Genomic DNA Mini Kit. Para más detalles, consultar este manual.

Etapa	Procedimiento																								
Preparación del lisado	<p>Preparar el lisado utilizando el protocolo adecuado para la muestra, como se indica a continuación:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;"><u>Muestra</u></th> <th style="text-align: left;"><u>Cantidad</u></th> <th style="text-align: right;"><u>Página No.</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Células de mamífero, tejidos y cola de ratón</td> <td>5×10^8 células, ≤ 25 mg de tejido, 0.5–1 cm</td> <td style="text-align: right;">16</td> </tr> <tr> <td>Sangre</td> <td>≤ 1 mL de sangre no nucleada (se necesitan reactivos adicionales, ver página 17) 5–10 μL de sangre nucleada</td> <td style="text-align: right;">17</td> </tr> <tr> <td>Bacterias</td> <td>$\leq 2 \times 10^9$ células</td> <td style="text-align: right;">18</td> </tr> <tr> <td>Células de levadura</td> <td>$\leq 5 \times 10^7$ células</td> <td style="text-align: right;">19</td> </tr> <tr> <td>Hisopos bucales</td> <td>Hisopos bucales humanos</td> <td style="text-align: right;">19</td> </tr> <tr> <td>Tejidos incluidos en parafina</td> <td>1–8 secciones de 5–15 μm de grosor y 20–50 mm² de área</td> <td style="text-align: right;">20</td> </tr> <tr> <td>Oragene™ saliva</td> <td>≤ 1 mL</td> <td style="text-align: right;">21</td> </tr> </tbody> </table>	<u>Muestra</u>	<u>Cantidad</u>	<u>Página No.</u>	Células de mamífero, tejidos y cola de ratón	5×10^8 células, ≤ 25 mg de tejido, 0.5–1 cm	16	Sangre	≤ 1 mL de sangre no nucleada (se necesitan reactivos adicionales, ver página 17) 5–10 μ L de sangre nucleada	17	Bacterias	$\leq 2 \times 10^9$ células	18	Células de levadura	$\leq 5 \times 10^7$ células	19	Hisopos bucales	Hisopos bucales humanos	19	Tejidos incluidos en parafina	1–8 secciones de 5–15 μ m de grosor y 20–50 mm ² de área	20	Oragene™ saliva	≤ 1 mL	21
<u>Muestra</u>	<u>Cantidad</u>	<u>Página No.</u>																							
Células de mamífero, tejidos y cola de ratón	5×10^8 células, ≤ 25 mg de tejido, 0.5–1 cm	16																							
Sangre	≤ 1 mL de sangre no nucleada (se necesitan reactivos adicionales, ver página 17) 5–10 μ L de sangre nucleada	17																							
Bacterias	$\leq 2 \times 10^9$ células	18																							
Células de levadura	$\leq 5 \times 10^7$ células	19																							
Hisopos bucales	Hisopos bucales humanos	19																							
Tejidos incluidos en parafina	1–8 secciones de 5–15 μ m de grosor y 20–50 mm ² de área	20																							
Oragene™ saliva	≤ 1 mL	21																							
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Remover la columna <i>PureLink® Spin Column</i> del tubo colector del empaque. 2. En la columna, cargar el lisado (~640 μL) con <i>Buffer de Lisis</i> y etanol preparado como se describió en las páginas 16–21 de <i>PureLink® Spin Column</i>. 3. Centrifugar la columna a 10,000 $\times g$ por 1 minuto a temperatura ambiente. 4. Descartar el tubo colector y colocar la columna dentro de un tubo colector nuevo. 5. Proceder al lavado del ADN. 																								
Lavado del ADN	<ol style="list-style-type: none"> 1. Lavar la columna con 500 μL de <i>Buffer de Lavado 1</i> preparado con etanol (página 23). 2. Centrifugar la columna a 10,000 $\times g$ por 1 minuto a temperatura ambiente. Descartar el tubo colector y colocar la columna en un tubo colector nuevo. 3. Lavar la columna con 500 μL <i>Buffer de Lavado 2</i> preparado con etanol (página 23). 4. Centrifugar la columna a máxima velocidad por 3 minutos a temperatura ambiente. Descartar el tubo colector. 5. Proceder con la Elución del ADN. 																								
Elución del ADN	<ol style="list-style-type: none"> 1. Colocar la columna dentro de un tubo de 1.5-mL de la microcentrífuga. 2. Eluir el ADN con 25–200 μL de <i>Buffer de Elución PureLink® Genomic</i>. Ver los Parámetros de Elución (página 13) para elegir el volumen de elución óptimo para sus necesidades. 3. Incubar la columna a temperatura ambiente por 1 minuto. 4. Centrifugar la columna a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente. <i>Este tubo contiene ADN purificado.</i> 5. Si se desea, efectuar una segunda elución para incrementar el rendimiento, disminuyendo la concentración de la disolución. <i>Este tubo contiene ADN purificado.</i> Remover y descartar la columna. 6. Utilizar el ADN genómico purificado para los análisis deseados. Almacenar el ADN genómico purificado a 4°C en caso de periodos de almacenaje cortos o a –20°C en caso de periodos más largos. 																								

ANEXO 5

CLART® PAPILOMAVIRUS HUMANO 2

GENOTIPADO DE PAPILOMAVIRUS HUMANO MEDIANTE IDENTIFICACIÓN GENÓMICA PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO

CLART® Papillomavirus Humano 2 detecta la presencia de los 35 virus de VPH (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 y 89) con mayor importancia clínica (ver fig. 1) en distintos tipos de muestras humanas (frotis, suspensiones celulares y tejido fijado en formol e incluido en parafina).

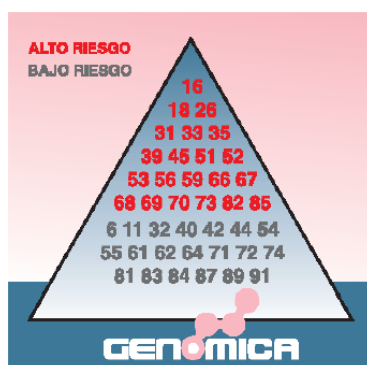


Figura 1: JAMA, Dunne et al., 2007

La detección se lleva a cabo mediante la **amplificación de un fragmento de unos 450 pb dentro de la región L1 del virus** por tratarse de una secuencia que está altamente conservada entre los distintos tipos de VPH. Sin embargo, esta región presenta suficientes variaciones como para poder diferenciar cada tipo de virus con sondas específicas. De esta manera, se asegura la especificidad de la detección.

La detección del producto amplificado por PCR se lleva a cabo mediante una nueva plataforma tecnológica basada en microarrays de baja densidad: CLART® (Clinical Array Technology). La plataforma se fundamenta en un principio muy sencillo pero a la vez muy cómodo y eficaz que consiste en incluir un microarray en la parte inferior de un tubo de 2 mL (Array Tube™-AT) o en el fondo de un pocillo de placa microtiter (CLART® Strip-CS) (figura 2), lo que simplifica todo el proceso de hibridación y visualización frente a los sistemas de arrays clásicos.



Figura 2. Plataforma CLART® Strip-CS en forma de tira de 8 pocillos.

El sistema de detección con **CLART® Papillomavirus humano 2** se basa en la precipitación de un producto insoluble en aquellas zonas del microarray en las que se produce la hibridación de los productos amplificados con las sondas específicas. Durante la PCR, los productos amplificados se marcan con biotina. Después de la amplificación, estos productos se hibridan con sus respectivas sondas específicas que están inmovilizadas en zonas concretas y conocidas del microarray, tras lo que se incuba con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa. El conjugado se une a través de la estreptavidina con la biotina presente en los productos amplificados (que a su vez se encuentran unidos a sus sondas específicas) y la actividad peroxidasa provoca la aparición de un producto insoluble en presencia del sustrato o-dianisidina, que precipita sobre las zonas del microarray en las que ocurre la hibridación (figura 3).



Figura 3: Esquema del método de visualización. Las sondas, inmovilizadas sobre la superficie, capturan sus productos amplificados complementarios marcados con biotina. A través de la biotina, se une el conjugado, en este caso estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano, HorseRadish Peroxidase). El sustrato o-dianisidina por la acción de la HRP, produce un precipitado sobre la zona en la que se produce la hibridación.

La sensibilidad obtenida combinando la amplificación genómica y la visualización en el microarray con el kit CLART® Papillomavirus Humano 2 es tan alta, que no es necesario hacer dobles amplificaciones (nested) evitando el riesgo de contaminación que éstas conllevan.

COMPONENTES Y CONSERVACIÓN DEL KIT

El kit **CLART® Papillomavirus Humano 2** contiene suficientes reactivos para la extracción y análisis del ADN de 24, 48 ó 96 muestras clínicas. Los reactivos incluidos en el kit se han agrupado en varias cajas, dependiendo de la temperatura a la que se han de conservar. Todos los reactivos son estables en las condiciones indicadas de conservación hasta la fecha de caducidad indicada.

1. Reactivos de amplificación

• Los reactivos de amplificación se envían a -20 °C. Son los siguientes:

Tubos de Amplificación contienen 45 µL de mezcla de reacción. Están listos para su uso y deben mantenerse a -20 °C. Sólo se deben descongelar sobre hielo el número preciso de tubos de amplificación que se vayan a procesar, conservando el resto de los tubos a la temperatura indicada.

En la caja del kit se incluye un indicador adhesivo e irreversible de temperatura; la aparición de un color rojizo en la ventana de visualización indica que en algún momento los productos han sobrepasado la temperatura de conservación de -20 °C y no deben utilizarse.

2. Reactivos de visualización

Se envían a 4 °C. Son los siguientes:

1. **Microarrays: Tubos AT o Tiras CS** (sondas específicas incluidas). Se suministran en un sobre termosellado. **Conservarlos siempre cerrados, a temperatura ambiente y protegidos de la luz.**
2. **SH** (Solución de Hibridación). **Conservar a 4 °C.**
3. **DC** (Diluyente de Conjugado). **Conservar a 4 °C.**
4. **CJ** (Conjugado). **Conservar a 4 °C.** Dar un pulso en la centrífuga antes de usar.
5. **RE** (Solución de Revelado). **Conservar a 4 °C.**
6. **TL** (Tampón de Lavado). **Conservar a 4 °C.**

7. Soporte y tapa para tiras de 8 pocillos.

¡ADVERTENCIA!: Una vez recibido el kit, los microarrays deben conservarse a temperatura ambiente.

3. Otros componentes

Para la captura y posterior procesamiento de la imagen se necesita un equipo o lector, un adaptador, y un software, capaces de generar de manera automática un informe por cada muestra analizada:

- **Lector CAR** (Clinical Array Reader) (figura 4): permite la lectura e interpretación automática de hasta 12 CS, es decir, de hasta un máximo de 96 muestras. En este lector también pueden leerse ATs. Está fabricado y distribuido por GENOMICA para su uso exclusivo con los kits de diagnóstico.
- Soporte adaptador que se coloca sobre la bandeja del CAR, sobre el cual se acopla la placa antes de la lectura.
- **Software**: específico para **CLART® HPV2**, diseñado y validado por GENOMICA.

CAR
(Clinical Array Reader)



Figura 4. CAR

MATERIAL REQUERIDO, NO SUMINISTRADO

1. Reactivos y material

- 1 Agua destilada.
- 2 Etanol 96%
- 3 Guantes desechables.
- 4 Puntas de pipeta con filtro o desplazamiento positivo.
- 5 Recipiente con hielo picado.
- 6 Tubos Eppendorf de 1.5 mL autoclavados.
- 7 Gradillas para tubos de 1.5 mL.
- 8 Soporte para tubos de 0.5 mL/0.2 mL.

2. Equipos

- 1 Microcentrifuga.
- 2 Termociclador.
- 3 Tres micropipetas ajustables entre 1-20 μ L, 20-200 μ L y 200-1000 μ L para el laboratorio de extracción.
- 4 Tres micropipetas ajustables entre 1-20 μ L, 20-200 μ L y 200-1000 μ L para el laboratorio de visualización.
- 5 Termomixer con agitación ajustable a 37, 55, 60 y 100 °C. Compatible con tubos tipo Eppendorf y con tiras de 8 pocillos.
- 6 Vortex.
- 7 Sistema de vacío (opcional).

RECOMENDACIONES Y PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACIÓN

¡Muy importante para evitar contaminaciones! Leer detenidamente antes de comenzar la técnica.

Recomendaciones generales:

1. La técnica se debe realizar en dos áreas separadas físicamente, para evitar la contaminación de las muestras con el producto amplificado anteriormente. Cada una de las áreas debe tener su propio material de trabajo identificado (pipetas, puntas, tubos, gradillas, guantes, etc.) y nunca debe salir de cada una de ellas.

1 Área pre-PCR: En esta área se hace la extracción del ADN y preparación de las muestras.

1 Área post-PCR: En esta área se lleva a cabo la amplificación y la visualización del producto amplificado. El material de esta área nunca ha de entrar en contacto con el del área de extracción. Evitar ir al área de pre-PCR después de haber estado trabajando en el área de visualización.

2. **Utilizar guantes en todo momento.** Es recomendable cambiarse de guantes con cierta frecuencia.

3. **Limpiar las zonas de trabajo** (poyatas, campanas, gradillas, pipetas, termociclador) en profundidad con lejía diluida al 10% **cada vez que se procese una tanda de muestras**, y obligatoriamente después de una contaminación.

4. **Emplear siempre puntas con filtro o pipetas de desplazamiento positivo** para evitar contaminaciones debidas a la micropipeta.

5. **Emplear material de laboratorio desechable y autoclavado.**

6. **Nunca mezclar reactivos de dos tubos diferentes aunque sean del mismo lote.**

7. **Cerrar los tubos de reactivos inmediatamente después de su uso para evitar contaminaciones.**

8. **Desechar** la punta de la micropipeta tras cada pipeteo.

9. **GENOMICA no se hace responsable de los resultados obtenidos con el kit si se emplean otras muestras distintas a las indicadas o ADN extraído por un protocolo distinto al indicado.**

Precauciones para la visualización

1. Evite que la punta de la pipeta o del sistema de vacío toque el fondo del tubo, ya que podría dañarse el micro-array situado en el fondo.

2. Se recomienda añadir cada solución sobre la pared del tubo AT/CS, nunca directamente sobre el fondo.

3. Es conveniente no añadir la solución SH hasta que se vayan a añadir los productos desnaturalizados de PCR.

4. En el caso de procesar AT es muy importante eliminar completamente todo resto de solución antes de añadir la siguiente.

En el caso de procesar CS se dejará un ligero remanente de volumen de manera que el array en ningún momento quede seco.

5. Tras la incubación con la solución CJ, es muy importante lavar bien el tubo AT/CS y la tapa del tubo para evitar que queden restos de éste y que reaccionen con la solución RE, produciendo un precipitado inespecífico que pueda dar lugar a interpretaciones erróneas del resultado.

6. Evite burbujas sobre la superficie del microarray al añadir cualquiera de las distintas soluciones.

7. Mantener limpia la base del tubo AT/CS para evitar posibles interferencias en la lectura de resultados.

8. Al visualizar la imagen en el lector, comprobar que aparezcan los marcadores de posición y de que no haya burbujas o manchas que interfieran en la lectura. En caso contrario, limpiar el fondo del tubo por fuera con un papel de celulosa o golpear suavemente el tubo con el dedo.

TOMA DE MUESTRAS

Tejido fijado en formol e incluido en parafina

Fijar las muestras en formol tamponado durante el menor tiempo posible (nunca más de 24 horas). El empleo de formol no tamponado o la fijación durante más de 24 horas puede degradar el ADN de la muestra. Es importante limpiar cuidadosamente la cuchilla con xileno, antes y después de cortar la muestra, para evitar arrastrar restos de otra muestra cortada anteriormente. Quitar con una cuchilla la parafina sobrante alrededor de la pieza. Hacer con el microtomo 2-3 cortes de 5 µm y ponerlos en un tubo estéril de 1.5 mL.

PROTOCOLO DE TRABAJO

Extracción del ADN: seguir la guía de usuario del equipo. El volumen de elución es 110 µL.

Una vez finalizada la extracción se toman con pipeta los 110 µL de ADN eluido y se introducen en tubos eppendorf de 1.5 mL. Utilizar 5 µL para la reacción de amplificación y guardar el resto a -20 °C.

Reacción de amplificación

1. Descongelar un **Tubo de Amplificación** por cada muestra que se va a estudiar y mantenerlos en hielo. No usar temperaturas superiores a 37 °C para la descongelación.
2. Centrifugar unos segundos los **Tubos de Amplificación** en la microcentrífuga para que quede todo el líquido en el fondo del tubo (si no se dispone de adaptadores de microcentrífuga para los **Tubos de Amplificación**, se pueden utilizar en su lugar tubos de un tamaño mayor a los que se les haya cortado la tapa).
3. Si el ADN ha sido obtenido de muestras incluidas en parafina, añadir 1.5 µL de Cloruro de Magnesio 25 mM en los tubos de amplificación.
4. Añadir 5 µL del ADN extraído de las muestras a los **Tubos de Amplificación** y resuspender varias veces con la micropipeta. Dejar los tubos en el hielo.
5. Programar en el termociclador los siguientes ciclos de temperaturas:

1 ciclo	95 °C 5 min
40 ciclos	94 °C 30 seg
	55 °C 60 seg
	72 °C 90 seg
1 ciclo	72 °C 8 min
20 °C continuo hasta la recogida de tubos (opcional)	

6. Arrancar el programa y colocar los Tubos de Amplificación en el termociclador cuando el bloque haya sobrepasado los 90 °C. De este modo se minimizan las posibles amplificaciones inespecíficas debidas a incubación por debajo de la temperatura de hibridación. La duración de la amplificación es de unas 4 horas, aunque puede variar ligeramente dependiendo del termociclador.

Visualización del producto amplificado

Visualización en CLART® Strip (CS)

Recomendaciones específicas antes de comenzar la visualización:

EL PROTOCOLO DESCRITO A CONTINUACIÓN SE DEBE REALIZAR SIEMPRE EN EL **ÁREA POST-PCR**. NUNCA LLEVAR EL PRODUCTO AMPLIFICADO AL ÁREA DE PRE-PCR.

1. Encender el CAR (Clinical Arrays Reader) al comienzo del proceso. La autocalibración del equipo tarda unos minutos y es necesario además introducir el nombre de las muestras de cada pocillo en el programa antes de la lectura. El aparato debe estar listo en el momento de la lectura para evitar esperas innecesarias que produzcan un exceso de revelado.
2. Asegurarse de que antes de comenzar la hibridación el termomixer de placas ha estado a 65 °C al menos durante 30 min ó 1 hora.
3. Atemperar la SH (solución de hibridación) a temperatura ambiente.
4. PREPARAR LA SOLUCIÓN DE LAVADO ANTES DE CADA ENSAYO, NO REUTILIZAR SOLUCIONES O RESTOS PREPARADAS CON ANTERIORIDAD.
5. Limpiar el termociclador con solución de lejía diluida al 10% antes de poner en marcha el programa de desnaturalización. Colocar los tubos de amplificación separados en el termociclador durante el proceso y nunca sobrepasar los 10 minutos de desnaturalización.
6. Durante la visualización no hace falta utilizar puntas con filtro pero sí es necesario usar una punta diferente para cada pocillo y cambiarla cada vez que se añada un reactivo, aunque se trate de TL. Sí es necesario utilizar puntas con filtro durante la adición de amplificados al tubo CS.
7. En el caso de utilizar bombas de vacío equipadas con peines de 8 puntas para aspirar las soluciones, desechar los peines después de cada uso o descontaminarlos con una solución de lejía diluida al 10% tras cada ensayo. Asegurarse de que la bomba aspira adecuadamente y no deja restos en el fondo del pocillo.
8. Aspirar completamente las diferentes soluciones dentro de los pocillos sin tocar el array.

VISUALIZACIÓN:

1. Desnaturalización: utilizar el termociclador para desnaturalizar los productos de PCR. Para este paso, colocar los tubos amplificados en el termociclador e incubar a 95 °C durante 10 minutos. Programar en el termociclador 15 minutos para que una vez transcurridos los 10 minutos los amplificados sigan a 95 °C. Sacar los tubos de la incubación a 95 °C y colocarlos inmediatamente en un recipiente con hielo.

2. Preparación de la Solución TL diluida:

Por cada tira CS (8 pocillos en total), preparar 10 mL de solución de lavado diluida, añadiendo 1 mL de Solución TL a 9 mL de agua destilada.

3. Prelavado de los CS: antes de empezar el ensayo es necesario lavar los tubos AT añadiendo 200 μ L de Solución TL diluida a cada pocillo del CS, resuspender de 10 a 15 veces con la pipeta multicanal, teniendo en cuenta que no se debe tocar la superficie del array. Desechar la Solución TL diluida con pipeta o preferiblemente con bomba de vacío. El array debe quedar sin restos de solución, aunque nunca debe permanecer seco durante mucho tiempo. Añadir la siguiente solución inmediatamente.

4. Hibridación: Antes de usar la Solución SH, ésta debe estar a temperatura ambiente. Una vez desnaturalizados los productos de PCR, añadir 100 μ L de solución SH (evitar que se forme espuma) a cada pocillo de los CS. Añadir 5 μ L de producto de PCR desnaturalizado a cada pocillo de los CS, resuspender varias veces para que se mezcle con la solución de hibridación, con cuidado de no tocar el cristal. Incubar la tira cubierta con la tapa de plástico transparente en el termomixer de placa tapado durante **1 hora a 65° C**, agitando a 550 rpm.

Tras esta incubación, sacar la placa y desechar la Solución SH con pipeta o bomba de vacío. (Dejamos programado el termomixer de placa a 30° C y en movimiento para su utilización posterior en el paso 6. Podemos quitar la tapa para que baje antes la temperatura).

5. Doble Lavado: usar puntas diferentes para cada pocillo en ambos lavados. Añadir 200 μ L de Solución TL diluida a cada pocillo del CS, resuspender de 10 a 15 veces con la pipeta multicanal. Desechar la Solución TL diluida con pipeta o preferiblemente con bomba de vacío multicanal. Repetir la operación. Si llegado a este paso, el termomixer no hubiera llegado a los 30 °C, se dejan los pocillos con esta solución hasta que el termomixer alcance la temperatura.

6. Bloqueo y conjugado: 15 minutos antes de concluir la hibridación, se debe preparar la solución CJ diluida y mantener en hielo. Se recomienda centrifugar la solución CJ durante 10 segundos antes de usarla. A continuación, preparar la solución CJ diluida. Por cada CS, se añade 1 mL de solución DC y 7.5 μ L de Solución CJ. Se debe dar un vórtex a la solución una vez diluida para homogenizar.

Desechar la Solución TL diluida sin dejar seco el array y añadir a cada pocillo del CS 100 μ L de Solución CJ diluida. Incubar durante 15 minutos exactos en el termomixer de placa a 30° C, agitando a 550 rpm. Tras esta incubación, sacar la placa y desechar la solución rápidamente con pipeta o bomba de vacío multicanal. (Dejar programado el termomixer de placa a 25 °C y en movimiento para su utilización posterior en el paso 8. Podemos quitar la tapa para que baje antes la temperatura).

7. Triple Lavado: **añadir inmediatamente** 200 μ L de Solución TL diluida a cada pocillo del CS, resuspender de 10 a 15 veces con la pipeta multicanal y desechar la solución con la pipeta o vacío **sin dejar seco el array. Repetir la operación dos veces más.**

Es muy importante que no queden restos de Solución CJ ya que ésta reaccionaría con la Solución RE dando lugar a una señal inespecífica.

8. Revelado con Solución RE: quitar la solución TL diluida sin dejar seco el array, añadir 100 μ L de solución RE a cada pocillo del CS e incubar 10 minutos a 25 °C en el termomixer de placa **sin agitación**.

¡Advertencia! Es muy importante utilizar el termomixer sin agitación

9. Desechar la Solución RE completamente con pipeta o vacío. El array debe quedar seco

10. CAR (Clinical Arrays Reader): Se coloca un adaptador especial sobre la bandeja del CAR y a continuación se colocará la placa en el CAR para tomar las imágenes de todos los pocillos para posteriormente ser analizadas automáticamente.

LECTURA DE RESULTADOS

El procesamiento de los datos obtenidos a partir de cada uno de los análisis, se realiza de forma automática. El equipo de lectura y análisis presentará un informe en el que se indican los resultados.