



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA

TESIS DE MAESTRÍA

Correlación de los niveles de expresión de la proteína E4 en saliva y
cérvix en pacientes con infección por Virus Papiloma Humano (VPH)
genotipos de alto riesgo. Estudio Piloto en dos centros.

ALUMNA

C.D.P.B. Celina García Ramos

DIRECTOR DE TESIS

D. en C. Úrsula Fabiola Medina Moreno

No. de CVU: 308929

Identificador de ORCID: 0000-0003-4906-223X

CO- DIRECTORA

D. en C. Sofía Bernal Silva

No. de CVU:

Identificador de ORCID: 0000-0002-6032-3982

ASESORES

M. en C. Mauricio Pierdant Pérez

No. de CVU: 278349

Identificador de ORCID: 0000-0002-4606-0071

Dr. Antonio J. Briseño Sáinz

No. de CVU: 1229332

Identificador de ORCID:

M. en C. José de Jesús Zermeño Nava

No. de CVU: 375729

Identificador de ORCID: 0000-0001-6938-0716

M. en C. Sandra Cadena Mota

No. de CVU: 479670

Identificador de ORCID:

San Luis Potosí, S.L.P. Febrero 2024

DIRECTOR DE TESIS	
D. en C. Ursula Fabiola Medina Moreno	
CO-DIRECTOR	DE TESIS
D. en C. Sofía Bernal Silva	
ASESORES	
M. en C. Mauricio Pierdant Pérez	
Dr. Antonio J. Briseño Sáinz	
M. en C. José de Jesús Zermeño Nava	
M. en C. Sandra Cadena Mota	
SINODALES	
D. en C. Ildefonso Rodríguez Leyva Sinodal Interno	
D.C.A. Alejandra Abigail Berumen Rodríguez Sinodal Interno	
M. en C. Josué Sidonio Rodríguez Cuevas Sinodal Externo	
M.E.P.B. José David Ramos Baena Sinodal Externo	
Dra. María Esther Jiménez Cataño Secretaría de Investigación y Posgrado Facultad de Medicina, UASLP	D. en C. Antonio Augusto Gordillo Moscoso Coordinador de la Maestría en Ciencias en Investigación Clínica Facultad de Medicina, UASLP



CONAHCYT

CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS

Celina García Ramos

Convocatoria Becas Nacional (Tradicional) **2020-1**
Numero de Registro CVU **671957**



Correlación de los niveles de expresión de la proteína E4 en saliva y cérvix en
pacientes con infección por Virus Papiloma Humano (VPH) genotipos de alto riesgo.
Estudio Piloto Multicéntrico © 2024 Por Celina García Ramos. Se distribuye
bajo [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

1. Resumen

Introducción

El virus papiloma humano (VPH), es un virus pequeño que pertenece a la familia “papillomaviridae”, el cual infecta específicamente piel y mucosas causando múltiples lesiones desde benignas hasta neoplasias malignas, como el cáncer cervicouterino. Se clasifica en genotipos de bajo y alto riesgo, siendo estos últimos los responsables de la progresión a cáncer. En la actualidad se busca contar con biomarcadores para el diagnóstico, como las proteínas virales del VPH.

Objetivos

Evaluar la correlación de los niveles de expresión del ARNm de E4 en saliva y en cérvix en pacientes con infección por VPH genotipos de alto riesgo, mediante *reacción en cadena de polimerasa* (PCR).

Materiales y métodos

Se realizó un transversal multicéntrico, estudio piloto. Se reclutaron 88 pacientes femeninas tomando muestras de cérvix y de saliva en cada una de ellas. Se eliminaron 53, quedando 35 muestras para expresión de la proteína E4 mediante PCR.

Resultados

De las 35 muestras que resultaron positivas a genotipos de interés para nuestro estudio, se procedió a la expresión del ARN mensajero de la proteína E4. Se pudo observar que 18 amplificaron en cérvix, siendo positivas a la expresión de E4. Teniendo un grupo de 17 muestras sin amplificación. Se realizó el análisis comparativo de ambos grupos, donde no hubo diferencias significativas.

Sin embargo, observamos que el genotipo más prevalente dentro de nuestra población fue el pool del genotipo 33 con un 20.5%, seguido del pool del genotipo 31 con un 9.1% y el genotipo 18 con un 9.1%.

Conclusiones

Se observaron muestras en cérvix que expresaron la proteína E4 en un 51.42%, contrario a las muestras de saliva, las cuales en su totalidad resultaron negativas para su expresión. Por lo tanto, no pudimos correlacionar la expresión de ambos sitios anatómicos de las pacientes que resultaron positivas a infección por VPH.

2. Índice

1. Resumen	4
2. Índice	5
2.1 Índice de imágenes.....	9
2.2 Índice de figuras.....	9
2.3 Índice de tablas	9
3. Antecedentes.	13
3.1 Virus Papiloma Humano.....	13
3.1.1 Clasificación del VPH.....	13
3.1.2 Prevalencia.....	15
3.1.3 Lesiones clínicas relacionadas al VPH.....	16
3.1.4 Fisiopatología del VPH	17
3.1.5 Ciclo celular del VPH.....	18
3.1.6 Evolución a cáncer.....	20
3.2 Cáncer cervicouterino.....	21
3.2.1 Factores de riesgo para Cáncer	21
3.3 Métodos de detección y diagnóstico de VPH	22
3.3.1 Papanicolaou.....	23
3.3.2 Colposcopia	23
3.3.3 Biopsia.....	24
3.3.4 PCR	24
3.4 Otros métodos diagnósticos.....	25
3.4.1 Saliva	25
3.5 Biomarcadores del VPH.....	26
3.5.1 Proteínas virales del VPH.....	26
3.5.2 Proteína E4.....	27
4. Pregunta de investigación	30

5. Justificación	31
6. Hipótesis	33
7. Objetivos.....	34
7.1 <i>Objetivo general.....</i>	<i>34</i>
7.2 <i>Objetivos específicos</i>	<i>34</i>
7.3 <i>Objetivos secundarios</i>	<i>34</i>
8. Material y Métodos.....	35
8.1 <i>Diseño del estudio</i>	<i>35</i>
8.2 <i>Metodología.....</i>	<i>35</i>
8.3 <i>Universo de estudio.....</i>	<i>35</i>
8.4 <i>Criterios de selección.....</i>	<i>36</i>
8.4.1 <i>Inclusión</i>	<i>36</i>
8.4.2 <i>No inclusión.....</i>	<i>36</i>
8.4.3 <i>Eliminación</i>	<i>36</i>
9. Toma de muestra	37
9.1 <i>Cadena de custodia</i>	<i>38</i>
9.2 <i>Procesamiento de las muestras de saliva y cérvix.....</i>	<i>39</i>
9.2.1 <i>Para las muestras de cérvix:.....</i>	<i>39</i>
9.3 <i>Procesamiento de ADN.....</i>	<i>39</i>
9.3.1 <i>Método de extracción de ADN</i>	<i>39</i>
9.4 <i>Concentración y calidad del ADN para ambas muestras</i>	<i>40</i>
9.5 <i>Detección y genotipificación de VPH.....</i>	<i>40</i>
9.6 <i>Diseño de oligonucleótidos.....</i>	<i>41</i>
9.7 <i>Expresión del ARN mensajero de E4.....</i>	<i>42</i>
10. Calidad de las mediciones.....	44
11. Análisis estadístico	45
11.1 <i>Análisis descriptivo</i>	<i>45</i>
11.2 <i>Estadística inferencial</i>	<i>45</i>
11.3 <i>Variables en el estudio</i>	<i>46</i>

11.4	<i>Método de aleatorización</i>	47
11.5	<i>Tamaño de la muestra</i>	47
12.	Aspectos éticos	48
12.1	<i>Investigación con riesgo mínimo</i>	48
13.	Plan de trabajo	49
14.	Recursos	51
14.1	<i>Recursos humanos y actividades</i>	51
14.2	<i>Recursos materiales</i>	52
15.	Capacitación de personal	53
16.	Financiamiento	53
17.	Resultados	54
18.	Discusión	67
18.1	<i>Limitaciones del estudio</i>	73
18.2	<i>Fortalezas del estudio</i>	74
18.3	<i>Perspectivas</i>	74
19.	Conclusiones	75
20.	Referencias bibliográficas	76
21.	Anexos	81
21.1	<i>Consentimiento Informado</i>	81
21.2	<i>Aviso de privacidad</i>	88
21.3	<i>Hoja de Recolección de datos</i>	90
21.4	<i>Cronograma de actividades</i>	91
21.5	<i>Carta de aceptación del comité académico</i>	92
21.6	<i>Carta de Colaboración del consultorio privado</i>	93
21.7	<i>Comisión de bioética de San Luis Potosí, secretaria de Servicios de Salud (SSA)</i>	94
21.12	<i>Manual Operativo</i>	95
21.13	<i>Kit Genotipificación VPH</i>	100
21.14	<i>TaqGold</i>	101

21.15	<i>Inserto Kit Omega Plex.....</i>	<i>102</i>
21.16	<i>Inserto Kit Extracción ARN cérvix.....</i>	<i>105</i>
21.17	<i>Inserto Kit extracción ARN saliva</i>	<i>107</i>
21.18	<i>Tabla revisión de artículos</i>	<i>111</i>
21.19	<i>CVU de los investigadores.....</i>	<i>114</i>
21.20	<i>Carta de conflicto de No interés por parte de los investigadores</i>	<i>114</i>
21.21	<i>Markdown.....</i>	<i>115</i>

2.1 Índice de imágenes

<i>Imagen 1. Especies del VPH</i>	<i>14</i>
<i>Imagen 2. Cambios en el epitelio por VPH</i>	<i>19</i>
<i>Imagen 3. Evolución a cáncer</i>	<i>20</i>

2.2 Índice de figuras

<i>Figura 1. Factores de riesgo para cáncer cervicouterino</i>	<i>22</i>
<i>Figura 2. Factores de riesgo para cáncer cervicouterino</i>	<i>22</i>
<i>Figura 3. Plan de trabajo esquematizado</i>	<i>50</i>
<i>Figura 4. Flujograma de participantes en el estudio.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 5. Imágen representativa de la amplificación de la PCR punto final con gen constitutivo.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 6. Imágenes representativas de la detección y genotipificación de VPH de alto riesgo con el kit Ω-Plex VPH de Gene2Life.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 8. Imágenes representativas de amplificación de la PCR cADN cérvix (A) y cADN saliva (B)</i>	<i>60</i>
<i>Figura 9. Imágen representativa de la amplificación del ARNm de E4 para VPH16</i>	<i>61</i>
<i>Figura 10. Imágenes de la amplificación del ARNm de E4 para VPH 18.</i>	<i>62</i>
<i>Figura 11. Imágen de la amplificación del ARNm de E4 en cérvix para A) VPH 33, B) VPH 58.....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 12. Amplificación del ARNm de E4 en saliva para VPH 33 y VPH 58.</i>	<i>64</i>

2.3 Índice de tablas

<i>Tabla 1. Prevalencia infección por Virus Papiloma Humano</i>	<i>15</i>
<i>Tabla 2. Diseño de oligonucleótidos VPH 16, 18, 33 y 58</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 3. Variables.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabla 4. Datos descriptivos de la población total del estudio.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabla 5. Variables descriptivas sobre factores de riesgo para infección por VPH.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 6. Genotipos de alto riesgo en paciente que fueron positivas a VPH</i>	<i>59</i>
<i>Tabla 7. Amplificación de la expresión de ARN mensajero de la proteína E4, en aquellas pacientes positivas a los genotipos de interés (16,18,33 y 58)</i>	<i>65</i>

Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

CaCu: Cáncer Cervicouterino

COCE: Carcinoma Oral de Células Escamosas

E1, E2, E4, E6, E7: Proteínas de expresión temprana

EGFR: Factor de crecimiento epidérmico

L1, L2: proteínas de expresión tardía

ORFs: Open Reading Frames

PCR: Polymerase chain reaction

VPH: Virus Papiloma Humano

ASCUS: Anomalías en las células escamosas del cuello de significado incierto por sus siglas en inglés. (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance)

NIC 1, 2 y 3 : Clasificación de neoplasia intraepitelial cervical

Oligos: Oligonucleótidos

Definiciones

- **Aminoácidos:** compuestos orgánicos que forman proteínas. Compuestos por un grupo amino y un grupo carboxilo
- **Coilocitos:** células con cambios nucleares que indican infección por VPH.
- **Cluster:** Racimo; grupo.
- **Electroforesis:** técnica que utiliza una corriente eléctrica para separar moléculas, proteínas o el ADN y ARN.
- **Etapas G2:** Fase del ciclo celular, donde la célula crece, produce proteínas y organelos para la mitosis.
- **Exofítico:** Se entiende como lesión exofítica una lesión sólida, excrecente y circunscrita, que hace relieve franco sobre de la mucosa o dermis, detectable a la exploración.
- **Hiperplasia:** Aumento en el número de células.
- **Patogenicidad:** La patogenicidad se define como la capacidad de un virus para causar enfermedad en un hospedador infectado.
- **Polimerasa alfa:** enzima que se encarga del inicio de la duplicación de ADN.
- **Proteína E4:** proteína de fusión E1'E4, sintetizada como resultado del acoplamiento del ARN mensajero.
- **VPH 16:** Virus papiloma humano genotipo de alto grado.
- **VPH 18:** Virus Papiloma Humano genotipo de alto grado.
- **VPH 33:** Virus Papiloma Humano genotipo de alto grado.
- **VPH 58:** Virus Papiloma Humano genotipo de alto grado.

- **Topoisomerasa:** Enzimas encargadas de cortar las cadenas de ADN.
- **Tropismo:** Especificidad de un virus para infectar a un determinado tipo de célula o tejido.
- **Cq's:** Número de ciclos en el que la fluorescencia empieza a ser detectada. A menor Cq's, mayor es la concentración.
- **ASCUS:** células escamosas atípicas de significado indeterminado.

3. Antecedentes.

3.1 Virus Papiloma Humano

El virus papiloma humano (VPH), es un virus pequeño que mide aproximadamente 50nm de diámetro, no envuelto con doble hélice de ADN. Pertenece a la familia “papillomaviridae”, el cual infecta específicamente piel y mucosas causando múltiples lesiones papilomatosas (1).

Se transmite principalmente por vía sexual y/o autoinoculación, en el caso de las lesiones en piel y es el responsable de lesiones tanto benignas como malignas que desencadenan carcinoma cervicouterino, en orofaringe y actualmente siendo estudiado como factor etiológico del carcinoma de cavidad oral (2).

El VPH se clasifica según sus propiedades oncogénicas; en grupos de bajo riesgo oncogénico (2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 29, 32, 40, 42, 43, 44, 54, 57, 61, 62, 70, 72, 74, 78, 81, 83, 84, 86, 87, 89, 90, 91 y 94) responsables de lesiones benignas como papilomas, verrugas plantares y condilomas. Y de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 67, 68, 70, 73 y 85) los causantes de neoplasias malignas (2).

3.1.1 Clasificación del VPH

Alrededor de 200 tipos de VPH se han logrado secuenciar, sin embargo, se dice que existen muchos tipos más. Dentro de la clasificación del VPH, de acuerdo con la capacidad de infectar mucosa o piel, hay géneros, especies y tipos (3).

Se cree que el virus comenzó a desarrollarse hace 90 millones de años. Esta misma evolución del virus, le permitió la capacidad de aprovechar las proteínas humanas para su replicación y afectar el sistema celular e inmunológico del humano. Las especies corresponden a la diversidad genotípica y aproximadamente del 80-90% la misma especie comparte propiedades biológicas, como: tropismo del tejido, manifestación clínica y patogenicidad (6,3).

Los géneros se clasifican en cinco categorías: *Alfapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomaviruses* y *Nupapillomavirus*. De los cuales los tipos

alfa y beta son los más importantes, debido a su tropismo, y específicamente el género alfa es que este asociado a neoplasias malignas en diferentes sitios anatómicos (3).

Siendo el grupo *alfa* el responsable de las infecciones en mucosa y piel, por ejemplo, en el tracto genital y lesiones cutáneas benignas. Los géneros que afectan mucosa se dividen en tipos de bajo y alto riesgo. La progresión a malignidad está estrechamente relacionada a los tipos de alto riesgo, los cuales conllevan a una proliferación celular excesiva y acumulación del daño genético en las células infectadas (4).

El género *beta*, son tipos de VPH que tiene predilección por la dermis y se asocian a otros factores de riesgo para desarrollar cáncer de piel (5).

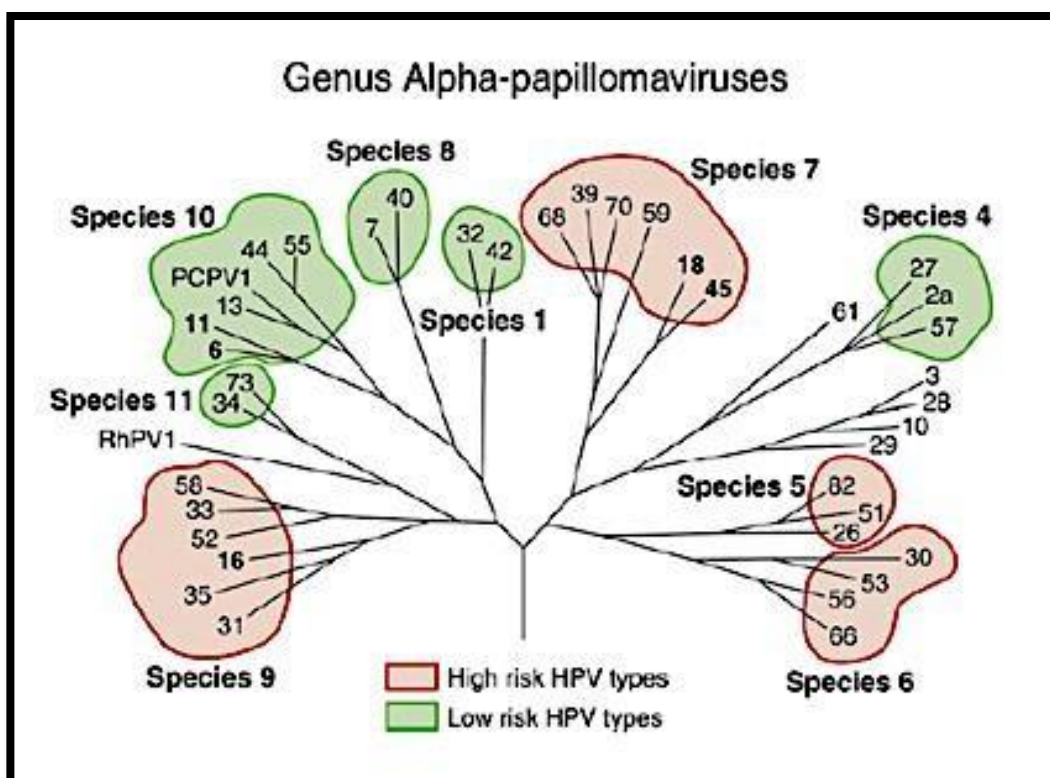


Imagen 1. Especies del VPH. Imagen tomada de: Rautava J and Syrjänen S. *Biología del virus papiloma humano, Infecciones en Cabeza y Cuello carcinogénesis. Head Neck Pathol. 2012*

3.1.2 Prevalencia

En México, se estima que aproximadamente el 43% de los hombres y el 17.5% de las mujeres, han presentado una infección por VPH (6).

Según el boletín nacional epidemiológico, a nivel nacional en el año 2019 se registraron 19,739 casos de VPH y San Luis Potosí, S.L.P alcanzó 1.7% de infección por VPH. En el 2020, a nivel nacional 8,072 casos, donde el estado S.L.P alcanzó un 3%. En el año 2021 a nivel nacional se reportaron un total de 11,896 casos, S.L.P registró un 2.5% de estos. Y por último el año 2022 se registraron 15,858 casos a nivel nacional y un 2% correspondiente a S.L.P. (7).

	Nivel Nacional (Número de casos)	Estado San Luis Potosí (%)
2019	19,739	1.7%
2020	8,072	3%
2021	11,896	2.5%
2022	15,858	2%

Tabla 1. Prevalencia infección por Virus Papiloma Humano

El cáncer cervicouterino ocupa el tercer lugar, dentro de las neoplasias malignas que afectan a mujeres en todo el mundo. Con un estimado de 311,365 muertes en 2018, es el segundo cáncer más común en mujeres entre los 15-44 años (6).

En América Latina, cerca de 32,000 mujeres mueren a causa de CaCu y en México, se diagnostican alrededor de 7,869 nuevos casos de cáncer cervicouterino al año. Ocupa el tercer lugar dentro del cáncer que afecta a la población femenina (2). Los tipos oncogénicos del VPH, 16 y 18 se detectaron aproximadamente en el 70% de los casos de cáncer cervical (8).

La prevalencia de estos tipos de alto riesgo es diversa dependiendo de la zona geográfica del país, sin embargo, predominan el 16, 18, 59 y 31 (4,9).

3.1.3 Lesiones clínicas relacionadas al VPH

Clínicamente, se comienza como una infección la cual no es diagnosticada y se vuelve persistente, posteriormente resulta en una progresión a cáncer. La infección toma lugar a nivel de la membrana basal del epitelio, mediante micro abrasiones. Una vez infectadas las células epiteliales, las proteínas virales del VPH comienzan la transcripción del genoma y así durante el ciclo celular, por medio de la diferenciación de los demás estratos epiteliales, el genoma viral se amplifica (9,10).

De acuerdo con el tropismo y a la filogenia del virus, se determina la asociación al tipo de lesión clínica. Ya que los diferentes genotipos de VPH, pueden causar desde lesiones benignas hasta lesiones que se desarrollan a malignidad (1) .

Las lesiones benignas más comunes son las verrugas vulgares, que muestran un patrón exofítico e hiperplásico, como por ejemplo las verrugas plantares y las verrugas en el área genital, denominadas condilomas (11).

También se presentan lesiones con proyecciones de queratina o exofíticas en la mucosa de la cavidad oral. Estas lesiones clínicas son llamadas papilomas de células escamosas (11).

La transmisión del virus puede ser de manera perinatal o “transmisión vertical”, es decir, de la madre al recién nacido. Causando infección en varios sitios mucosos de los recién nacido, como cavidad oral, genitales y conjuntiva. Las verrugas cutáneas causadas por *Betapapillomavirus*, son comunes también en niños y puede pasar un tiempo de hasta 4 años para su primera manifestación clínica (12).

La entidad patológica maligna más importante ligada al VPH, es el cáncer cervicouterino. Desde 1995, la OMS lo estableció como un agente viral promotor de malignidad. El genotipo 16 se le atribuye el 55% del Cáncer cervicouterino (CaCu) y al 18, el 15% (13).

También el virus se ha asociado a otros tipos de cáncer, incluyendo orofaringe, esófago, anal, próstata y colon (13).

3.1.4 Fisiopatología del VPH

Las infecciones tienen un periodo de vida de algunos meses, hasta que el sistema inmune se encarga de eliminarla. Sin embargo, si en la célula huésped la infección se convierte en persistente y el sistema inmune no la detecta existe una posibilidad de la progresión a cáncer. Existen cambios celulares, asociados en el ciclo viral (14). La regularización de la carga viral para la infección también depende del sitio de infección. El cual marca un gran cambio entre los viriones de la dermis y mucosa (1) .

En neoplasias malignas inducidas por VPH, es importante hacer énfasis en que debido a ciertos factores como por ejemplo la localización anatómica en el caso del cérvix u orofaringe, es difícil el diagnóstico en etapas tempranas y el proceso maligno se detecta en etapas más avanzadas (2).

La infección por VPH se presenta por etapas. Desde la aguda, seguida por la crónica y una etapa poco descrita, pero se sabe que el virus entra en un periodo de latencia el cual responde a una infección subsecuente o a una reactivación (15).

La detección clínica es un poco ambigua. En una infección aguda después de una exposición al virus, específicamente cuando hubo una relación sexual con una pareja infectada por VPH, el material genético puede ser detectado en el transcurso de días, incluso sin una infección tal cual establecida. A esto se le denomina detección transitoria. Sin embargo, el material genético presente puede ayudar a estimar si existe una infección aguda o latente (15).

El cáncer cervicouterino es un claro ejemplo de la carcinogénesis de una infección crónica por VPH, sin embargo, se concluye que las infecciones agudas inducen modificaciones a nivel celular y en el genoma viral causando con el tiempo lesiones que se consideran premalignas (15).

Cabe mencionar que el VPH es transmitido por vía sexual y por autoinoculación. Y otro dato importante es que el virus se ha detectado en otros sitios anatómicos, específicamente sitios mucosos, como el ano y la cavidad oral. Y esto a su vez se vincula con el desarrollo de cáncer anal y orofaríngeo respectivamente (16).

3.1.5 Ciclo celular del VPH

Mediante cambios estructurales de la misma cápside del virus, las proteínas L1 y L2 que facilitan la entrada a los queratinocitos ubicados en la membrana basal. La proteína L2 también se encarga de posicionar el genoma viral en el núcleo de las células epiteliales. Este proceso requiere de la activación de mitosis que a su vez esta mediada por ambas proteínas. Una vez, establecido el dominio nuclear, se activa la infección y se permite la transcripción del genoma viral (11).

Una vez que la célula huésped está infectada, se estimula la proliferación y el comienzo de una división celular. Esta división celular activa, es necesaria para que el genoma viral cumpla su objetivo de llegar al núcleo (17).

Específicamente los tipos de VPH de alto riesgo se unen a laminina 332 y a proteoglucanos heparán sulfato, y así activan los receptores de crecimiento en la superficie celular (9).

El genoma se posiciona dentro de la célula huésped, seguido por una amplificación inicial controlada por las proteínas E1 y E2. Esta amplificación es seguida por la expresión de E6 y E7, lo que conlleva a un incremento de la proliferación celular. Específicamente E6 se encarga de inhibir p53 y de activar la actividad telomerasa. E7 contribuye a la replicación viral, incrementando la proliferación en las células epiteliales, mediante la desactivación de Rb. Ambas proteínas conducen a la célula a para que vuelva a entrar a la fase S del ciclo celular lo que conduce a la replicación viral (17).

Las proteínas encargadas de la replicación son E4 y E5. En etapas más tardías de la replicación, el genoma es empaquetado y liberado al epitelio (1,17).

En el mantenimiento del genoma, Se cree que la infección esta precedida por una fase inicial de la amplificación del genoma. Y por el mantenimiento del episoma viral con bajas copias (4,17).

Las proteínas encargadas de la replicación, E1 y E2, se cree que son esenciales para la fase de amplificación, pero también indispensables para mantener la replicación de las copias presentes en las células basales (1,17).

En infecciones por tipos de alto riesgo, la proliferación de las células basales inducida por proteínas E6 y E7, facilitan la expansión de la lesión. La proteína E6 inactiva la función de p53, lo que conlleva a una importante función del ciclo celular (14,17).

Por esto mismo, se puede concluir de alguna manera que las células “blanco” de esta infección tienen la característica de ser escamosas y/o columnares, siendo estas las que se encuentran en el endocérnix (9,7).

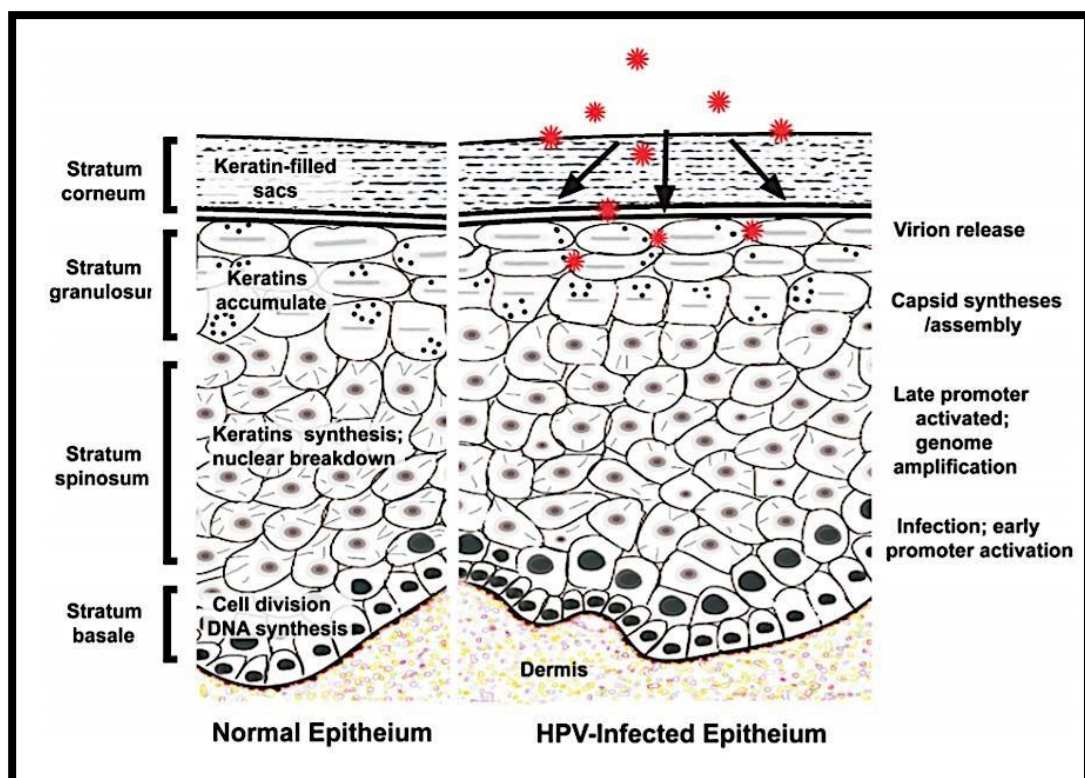


Imagen 2. Cambios en el epitelio por VPH. Imagen tomada de: Kim SM. Human papilloma virus in oral cancer. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg. 2016;42(6):327336. doi:10.5125/jkaoms.2016.42.6.327

3.1.6 Evolución a cáncer

Las infecciones por VPH pueden ser transitorias y llegar a un punto en donde pueden ser resueltas por el mismo sistema inmune del huésped, en un lapso de 6 a 24 meses. Sin embargo, cuando no es así las infecciones ganan cronicidad y se vuelven persistentes y más si se trata de serotipos oncogénicos, éstas evolucionan a cáncer (18).

La infección en el epitelio cervical tiene repercusión en el huésped, desencadenando factores como tumores supresores y factores de crecimiento tumorales. Lo que ocasiona un desequilibrio y conlleva a que las células epiteliales terminen con una progresión neoplásica (19).

Los factores asociados a esta persistencia y la progresión a malignidad aún no están del todo establecidos. Pero se asocia a la inmunosupresión del huésped que contribuyen a sucesos carcinogénicos y /o al tiempo de evolución. Y una acción sinérgica entre estos factores conllevan a tener altas posibilidades del desarrollo a malignidad (18).

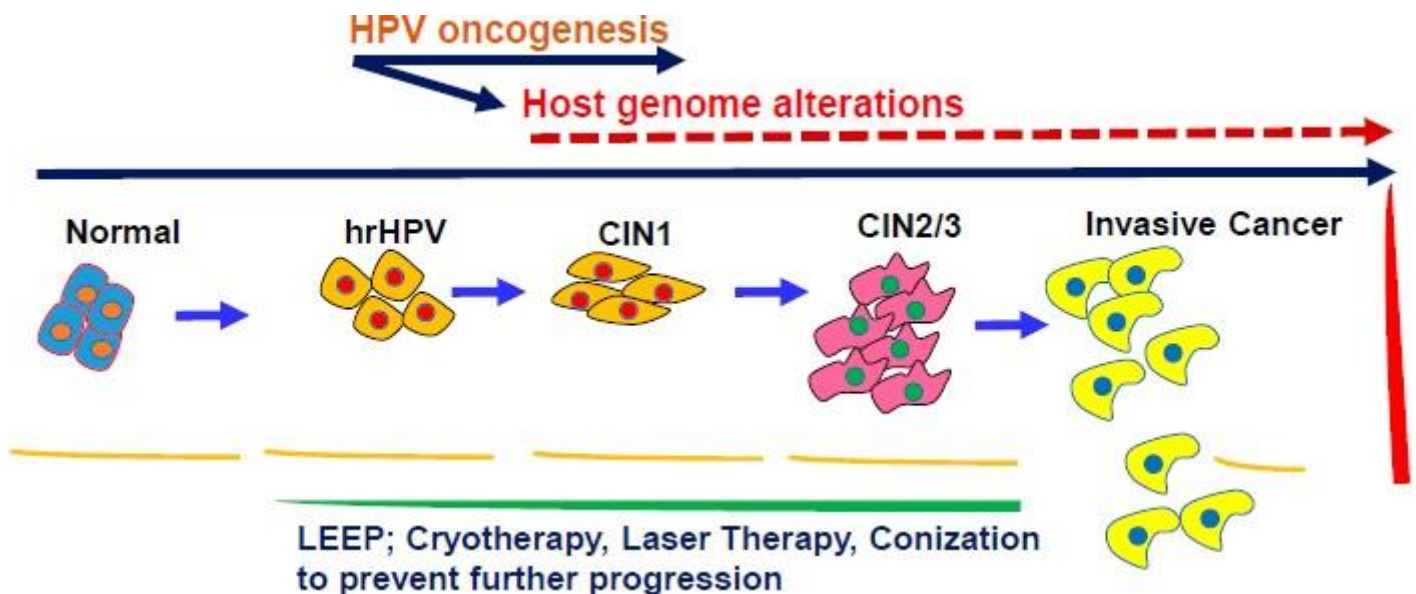


Imagen 3. Evolución a cáncer. Imagen tomada de Olusola P, Banerjee HN, Philley J V, Dasgupta S. Human Papilloma Virus-Associated Cervical Cancer and Health Disparities. Cells. 2019 Jun;8(6)

3.2 Cáncer cervicouterino

Estudios epidemiológicos demuestran la presencia de VPH en el 99% de los casos, concluyendo que el virus es el principal factor etiológico para este tipo de carcinoma, particularmente los genotipos 16 y 18 (20).

Esta enfermedad presenta un largo proceso de desarrollo, el cual va desde los 10 hasta los 30 años para presentar sintomatología y/o manifestación clínica (21).

El VPH infecta las células epiteliales en la zona de transformación cervical, donde se observa una clara metaplasia de un epitelio columnar a epitelio estratificado. Este cambio epitelial ocurre típicamente en la pubertad cuando las células endocervicales se exponen más a un ambiente más ácido de la vagina. La susceptibilidad de transformación a malignidad está ligada a la proliferación de las células basales, en la zona de metaplasia del epitelio. Se describe que esta metaplasia ocurre en el lapso de cambio entre la pubertad y el inicio de la actividad sexual. La expresión viral se da específicamente en estos sitios, dando lugar a la infección (3,21).

3.2.1 Factores de riesgo para Cáncer

Para el desarrollo de cáncer se necesita la sinergia de factores de riesgo o factores carcinogénicos y el factor tiempo, lo cual corresponde a varios años antes de que la neoplasia se encuentre establecida (18,22).

Como factores de riesgo para neoplasias, se encuentran los ya establecidos, tabaco y alcohol. Pero en la actualidad, se han agregado el comportamiento sexual que abarca desde el número de parejas sexuales hasta prácticas de riesgo como sexo oral o sexo anal. Incluso el empezar una vida sexual activa a temprana edad y cambios en la conducta sexual, como sexo sin protección, incrementan la posibilidad de una infección. (23).

Este factor de riesgo se ha encontrado como factor común entre adultos jóvenes, los cuales rompen con el estándar de los factores etiológicos y presentan menor consumo de alcohol y tabaco (18,24,25).

Por supuesto, el VPH que también juega un papel importante dentro de estos factores desencadenantes de neoplasias malignas. Se ha reportado, que las mujeres que cuentan con el antecedente de una infección cervical por VPH y especialmente aquellas que ya tuvieron el diagnóstico de una lesión intraepitelial, se consideran susceptibles para infección por VPH en otros sitios anatómicos (16).

Existen algunos otros factores que tienen menor impacto, sin embargo, forman parte de las causas. (24,25).

Factores de riesgo	VPH
	Tabaquismo
	Alcoholismo
	Paciente inmunocomprometido
	Número de parejas sexuales
	Anticonceptivos orales
	Embarazos multiples
	Estatus socioeconomico bajo

Figura 1. Factores de riesgo para cáncer cervicouterino

3.3 Métodos de detección y diagnóstico de VPH

Parte del éxito para el diagnóstico para estas infecciones relacionadas con CaCu, es la detección temprana de la infección y la identificación de factores de riesgo(26).

A pesar de las herramientas diagnósticas, los programas de prevención y las vacunas existentes, el VPH continúa afectando gran cantidad de personas a nivel mundial causando mortalidad y morbilidad en la sociedad (22,26).

La efectividad radica en el procedimiento de la toma o inclusive en que la detección se realiza en etapas tardías de la enfermedad. Específicamente hablando del sitio anatómico del cérvix donde el proceso carcinogénico es detectado en etapas avanzadas (19).

3.3.1 Papanicolaou

Prueba de tamizaje utilizado para el diagnóstico de lesiones cervicouterinas/CaCu. Citología utilizada desde 1928, cuando fue introducida por George Papanicolaou, ginecólogo y citopatólogo griego (27).

Esta herramienta diagnóstica consiste en una citología vaginal, en donde las células epiteliales son desprendidas mecánicamente del cérvix y, posteriormente se observa bajo el microscopio algún tipo de anormalidad, de ser así se identifican coilocitos referentes a células infectadas (13).

El papanicolaou sigue vigente hasta la fecha. Sin embargo, ha presentado algunas limitaciones que muchas veces no favorecen al diagnóstico. Estas limitaciones están relacionadas con los errores en la recolección de la muestra, así como con la interpretación del mismo clínico encargado del diagnóstico. También depende de cada cuanto tiempo las mujeres se realicen la citología. Por lo que el papanicolaou es útil para el diagnóstico de lesiones malignas inducidas por el VPH, en etapas tardías o cuando ya se trata de una neoplasia maligna establecida (28).

3.3.2 Colposcopia

La colposcopia consiste en la exploración del cuello uterino, la vagina y la vulva por medio de un microscopio, el cual permite observar los pliegues mucosos vaginales llegando hasta el cuello del útero (26).

Las pacientes que después de una citología presentan el diagnóstico de lesión intraepitelial, son referidas inmediatamente a colposcopia. Sin embargo, se dice que no todas las mujeres pasan directamente a colposcopia, esto depende del grado de la lesión encontrada en la citología (18).

Se ha reportado que la sensibilidad y especificidad de la colposcopia para la detección de lesiones intraepiteliales por infecciones inducidas por VPH fue de 47 y 78% respectivamente (29).

3.3.3 Biopsia

Herramienta diagnóstica que brinda un diagnóstico histopatológico definitivo. La cual consiste en la identificación e interpretación de alteraciones patológicas en un tejido, fluido corporal o inclusive de un órgano que ha sido tomado del cuerpo humano para su análisis. Para así determinar el diagnóstico y posteriormente el plan de tratamiento conveniente para la enfermedad o condición específica (30).

Cuando se trata de una biopsia por una infección por VPH, lo que se observa a nivel celular son los efectos citopáticos. Así como acantosis, disqueratosis y coilocitos. Estos últimos considerados la evidencia de la afección viral sobre la célula, la cual presenta un citoplasma amplio y un núcleo morfológicamente atípico (23).

3.3.4 PCR

Polymerase chain reaction o *reacción en cadena de polimerasa* (PCR), por sus siglas en inglés. Es una técnica de biología molecular, que consiste en la amplificación de secuencias de ADN o ARN mediante la enzima polimerasa (26).

Es sumamente útil para determinar el tipo de VPH que se encuentra involucrado en la entidad clínica y así poder establecer un pronóstico (22).

Tipificar el VPH, permite predecir el riesgo de desarrollar cáncer en los siguientes años, sin embargo, no puede diferenciar entre una infección activa de una infección persistente que evoluciona a lesiones pre cancerígenas y posteriormente a cáncer (22).

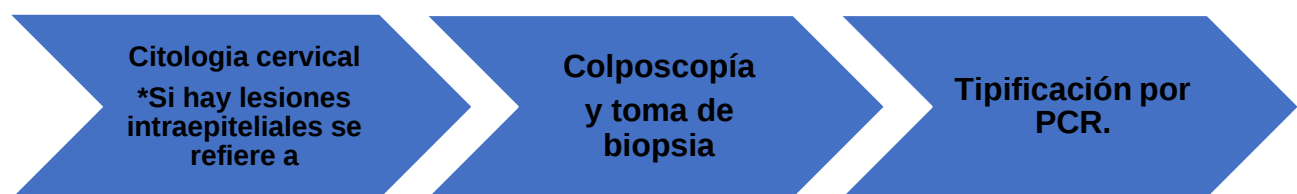


Figura 2. Métodos diagnósticos utilizados por etapas

3.4 Otros métodos diagnósticos

3.4.1 Saliva

La cavidad oral es una estructura anatómica que está en constante exposición a factores externos, por lo que su función fisiológica es primordial. También es un sitio expuesto a infecciones sistémicas y el colapso del sistema inmune provoca patologías con manifestación en cavidad oral (31). En el caso de la infección por VPH, se ha descrito que mujeres que tienen el antecedente de infección cervical o incluso lesión intraepitelial, son consideradas más susceptibles a presentar coinfección en otros sitios anatómicos. (16).

La saliva es un fluido complejo que tiene un rol de biomarcador, por sus características de mayor especificidad y sensibilidad en cuestión de diagnóstico, pronóstico, incluso en seguimiento y tratamiento de diferentes enfermedades (32).

Se ha observado la presencia de VPH tipo 16, en cavidad oral y que a su vez se encuentra relacionado con infecciones cervicales persistentes. En un estudio en donde se buscaba la detección de VPH en boca y en cérvix, pero mediante citología en ambos sitios, se encontró que la sensibilidad para la citología oral fue de 3.5% (33).

En un estudio realizado en pacientes con carcinoma orofaríngeo, se recolectaron muestras de saliva para detectar el VPH por PCR, en donde se arrojaron como resultados un 72% de sensibilidad y 90% de especificidad. Por lo que este método de diagnóstico resulta más práctico y poco invasivo para el paciente y sobre todo que es una manera de detectar la infección por VPH en etapas más tempranas (34).

3.5 Biomarcadores del VPH

3.5.1 Proteínas virales del VPH

Las proteínas denominadas “L” pertenecen a la parte de la cápside. **L1**, es la proteína que se utiliza para la clasificación filogenética del VPH y el rol más importante de esta proteína es la función viral que cumple. Promueve la unión del virión con los receptores de heparán sulfato en la membrana basal. Y la proteína **L2** es la encargada del ensamblaje y empaquetamiento del ADN. Son las últimas en expresarse por lo que se detectan en las capas de epitelio diferenciadas (4).

Las proteínas codificadas en la “*early region*”, 6 proteínas con diferentes funciones que incluyen la replicación viral y la transformación celular. **E1**, proteína encargada de formar un complejo dihexamérico atrayendo topoisomerasa I, polimerasa alfa y proteína de replicación, todo para la replicación viral. Así mismo la proteína **E1**, promueve la ruptura del ADN viral (4,14).

E2, tiene el papel de ser un regulador transcripcional de **E6** y **E7**. Junto con **E4**, forman un producto de proteínas denominado **E1'E4**, durante las últimas etapas del ciclo viral (35).

E4, se une a los filamentos de citoqueratinas presentes en las células epiteliales, ocasionando modificaciones en la estructura celular y juega un papel importante en la transmisión viral entre las células epiteliales. Esta proteína se expresa supra basal y en el estrato espinoso del epitelio, siendo la proteína que se expresa en mayor cantidad, contribuye con la liberación del virión (4).

E5, proteína de menor tamaño transmembranal, la cual activa el receptor del factor de crecimiento epidérmico *EGFR* (11). Y se encuentra relacionada con la progresión de malignidad ya que está relacionada con la actividad mitótica. También tiene al complejo mayor de histocompatibilidad I y se encarga de que la infección por VPH persista, por medio de la evasión del sistema inmune (14).

E6 y **E7**, estas oncoproteínas han sido las más estudiadas debido a su rol en la transformación maligna de la infección. Debido a que son las responsables de la interrupción de p53 y pRb, encargados de responder cuando el ADN se encuentra dañado (4).

La proteína E7, es la primera en expresarse una vez que la infección está presente en las células basales del epitelio. A diferencia de la proteína E4, que es la que se expresa durante la replicación viral (36).

3.5.2 Proteína E4

La proteína E4 viral se encuentra expresada en las infecciones de VPH de diferentes genotipos. Tiene un papel de biomarcador ya que se puede identificar en células que se encuentran sufriendo una amplificación del genoma viral. Debido a la cantidad expresada en los estratos epiteliales más superficiales, esta proteína es fácil de detectaren material biológico. Es por eso por lo que se le atribuye el rol de biomarcador en una infección activa por VPH (37).

Durante la replicación viral, E4 demostró tener una expresión entre las células de los estratos espinoso y granuloso del epitelio. También se encontró que la proteína aparece en forma de gránulos en el citoplasma de estas células infectadas. Lo que se conoce como efecto citopático, definido por los patólogos (37,38).

En los genotipos de alto riesgo, la proteína E4 tiene un papel importante durante las últimas etapas de replicación (37).

Esta proteína presenta un “clúster” de leucina que se asocia con la queratina, es por eso por lo que se dice que E4 puede modificar los filamentos de queratina presentes en la estructura celular para liberar el genoma viral (20,39).

Una de las funciones establecidas de la proteína E4, es la capacidad que tiene en provocar cambios morfológicos en la célula, específicamente en los queratinocitos. Por lo que la E4 afecta la integridad celular interrumpiendo sus funciones normales (40).

La habilidad de esta proteína de modificar la red de filamentos de queratina en el estrato corneo, facilita la transmisión viral. También una característica importante de la E4, es que participa en la inhibición de la etapa G2 de la proliferación y a su vez promueve la amplificación genómica que termina en la síntesis del virus (40).

Existen estudios previos, que proporcionan evidencia acerca de la proteína E4. De los cuales, es conveniente hacer énfasis en un estudio realizado en población masculina mexicana. Estudio en el cual buscaron la proteína E4 y E7, en diferentes sitios anatómicos. Dentro de los resultados encontraron un 45% de infección por VPH en múltiples sitios anatómicos. Sin embargo, el estudio presenta deficiencias metodológicas ya que se realizó solo en hombres y no se estandarizó la toma de muestra. (Se anexa tabla con estudios relacionados. [\(ANEXO\)](#)

El virus papiloma humano, debido a ser el factor carcinogénico en el cáncer cervicouterino, ha sido sumamente estudiado. Ya que este cáncer ocupa de los primeros lugares, tanto a nivel nacional como mundial, que afectan a las mujeres y que también maneja altas tasas de mortalidad.

Estos estudios dieron pie a conocer el mecanismo de infección y como se llegaba al desarrollo de cáncer. Incluso se incluyeron herramientas diagnósticas para conocer los serotipos causantes de malignidad y lo que permite poder establecer un pronóstico.

Desde hace años, se ha utilizado la citológica cervical como *gold estándar* para el tamizaje de esta enfermedad, seguido por la colposcopía. Sin embargo, son técnicas diagnósticas que se basan en la exploración clínica donde se busca la presencia de lesiones clínicas evidentes en estos sitios. Lo que se traduce a que las lesiones son producto de infecciones crónicas y persistentes por años en el huésped.

La infección de VPH tiene dos etapas, la activa/aguda y la crónica, la cual es la que se observa en las lesiones clínicas.

Por lo que, en la actualidad, los estudios se enfocan en tener biomarcadores que ayuden a poder detectar la infección temprana del VPH sin necesidad de tener la lesión evidente.

Agregando que la coinfección en diferentes sitios anatómicos puede estar presente, lo que puede comprometer aún más el pronóstico de la enfermedad, sobre todo si el diagnóstico se hace en etapas tardías.

4. Pregunta de investigación.

¿Cuál es la correlación entre los niveles de expresión del ARNm de la proteína E4 en saliva y cérvix en pacientes con infección por genotipos de alto riesgo del VPH?

5. Justificación.

El virus papiloma humano representa un problema de salud pública por su persistencia en la sociedad y que se trata de la infección sexual más común entre la población. Gracias a que se torna una infección persistente, juega un rol oncogénico que promueve el desarrollo de cáncer cervicouterino, el cual actualmente se encuentra dentro de los primeros lugares en las afecciones neoplásicas dentro de las mujeres entre los 15 y 45 años.

El VPH es una entidad que ha sido sumamente estudiada con el paso de los años, en donde se han establecidos características importantes del mismo virus como su papel oncogénico en diferentes carcinomas que afectan varios sitios del cuerpo humano, no solo el cervicouterino. Dentro de estos estudios, muchos se han enfocado en el análisis de ADN viral el cual permitió tipificar el virus y brindar un pronóstico. Pero el hecho de solamente tipificar no permite distinguir si se trata de una infección latente y tampoco excluir una infección activa donde el ADN viral se encuentre de manera pasiva. Por lo tanto, hay pocos estudios que se inclinan hacia los biomarcadores como las proteínas virales del VPH.

Por lo que el presente estudio se centra en la proteína E4, la cual se expresa abundantemente en el epitelio infectado por distintos genotipos del VPH y gracias a esta expresión le concede el potencial de ser un biomarcador en infecciones activas. Se busca la correlación de la presencia de la proteína, en ambos sitios anatómicos (cérvis y cavidad oral) ya que son los principales sitios de infección por VPH, tomando en cuenta su tropismo, así como a la alta posibilidad de una coinfección.

Utilizando a la saliva como vehículo para la detección temprana de infección por VPH, ya que ofrece las ventajas de un muestreo no invasivo y una recolección sumamente fácil. Pensando en un futuro, utilizarla como una herramienta de tamizaje e inclusive de seguimiento, que tenga la característica de ser poco invasiva y que gracias a esto sea atractiva para las pacientes por su comodidad y facilidad de la toma. Ya que consiste solo en recolectar 2 mL de saliva en un frasco estéril en comparación con la toma de un

papanicolaou, la cual consiste en una revisión ginecológica y un cepillado del cérvix. Lo que muchas veces resulta ser incómodo para las pacientes y como consecuencia posponen las revisiones.

No se pretende sustituir a la herramienta diagnóstica ya establecida, el *papanicolaou*, lo que se sugiere es que se pueden utilizar nuevos métodos de detecciones y seguimiento a una infección por VPH.

6. Hipótesis.

Existe una correlación positiva de los niveles de expresión del ARNm de E4 en el cérvix y saliva en pacientes con infección por VPH genotipos de alto riesgo.

7. Objetivos.

7.1 Objetivo general

Evaluar la correlación de los niveles de expresión del ARNm de E4 en saliva y en cérvix en pacientes con infección por VPH genotipos de alto riesgo, mediante *reacción en cadena de polimerasa* (PCR).

7.2 Objetivos específicos

- Determinar los niveles de expresión del ARNm de E4 en cérvix en pacientes con **VPH genotipos de alto riesgo (16,18,33 y 58)** mediante PCR tiempo real.
- Determinar los niveles de expresión del ARNm de E4 mediante PCR tiempo real en saliva en pacientes genotipificadas.
- Correlacionar los niveles de expresión del ARNm de E4 en saliva y cérvix en pacientes con infección por VPH.

7.3 Objetivos secundarios

- Determinar los factores de riesgo para coinfección en ambos sitios anatómicos.
- Asociar el consumo de tabaco y alcohol con el diagnóstico de VPH.

8. Material y Métodos

8.1 Diseño del estudio.

Transversal analítico en dos centros. Estudio piloto.

8.2 Metodología.

Lugar de realización:

- División de Ginecología del Hospital del niño y la mujer “Dr. Alberto López Hermosa”.
- Consultorio privado del Dr. José de Jesús Zermeño Nava, ubicado en: De Las Ciencias 110b, Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P.

8.3 Universo de estudio:

- Pacientes que acudieron al servicio de Ginecología, en el *Hospital del niño y la mujer* “Dr. Alberto López Hermosa”, por primera vez o a consulta subsecuente.
- Pacientes que acudieron por primera vez o consulta subsecuente al *consultorio privado* del Dr. José de Jesús Zermeño Nava,

8.4 Criterios de selección:

8.4.1 Inclusión

- Pacientes femeninos entre los 18 y 70 años. (**Hospital del niño y la mujer**)
- Pacientes que acudan a la clínica de displasias de la división de ginecología del Hospital, referidas de su centro salud por citología cervical anormal.
- Pacientes femeninos entre los 18 y 70 años. (**Consultorio privado**)
- Pacientes que acudan a consulta privada con el Dr. José de Jesús Zermeño Nava por una revisión o consulta de seguimiento.
- Pacientes que presenten infección por VPH en cérvix confirmado por citología.
- Pacientes que firmen el consentimiento informado.

8.4.2 No inclusión

- Pacientes que presenten sangrado menstrual o patológico.

8.4.3 Eliminación

- Pacientes que decidan revocar el consentimiento informado.
- Pacientes que tengan genotipo diferente a los genotipos de interés.
- Muestras insuficientes.

9. Toma de muestra

- Las muestras fueron tomadas de
 - a) Paciente que acudió a la clínica de displasias de la división de Ginecología del Hospital del Niño y la Mujer “Dr. Alberto López Hermosa”.
 - b) Paciente que acudió a consulta privada con el Dr. José Zermeño Nava, ubicado en: De Las Ciencias 110b, Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P.
- Aquellas pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión se invitaron a participar en el estudio, explicándoles en qué consistía su participación. Aquellas que aceptaron, bajo firma de consentimiento.
- Se realizó el llenado de la hoja de recolección de datos (tesista, CGR).
- Toma de muestra de saliva (realizada por la tesista, CGR):
 - A cada paciente se les proporcionó un frasco estéril, previamente etiquetado.
 - Se les pidió recolectar saliva hasta reunir 2mL.
 - La muestra de saliva se mantuvo a 4°, colocándola en una hielera, hasta su traslado al laboratorio de microbiología donde fue procesado y analizado: extracción del **ADN**, genotipificación del **VPH** y la expresión de ARNm de **E4**.
- Muestra de cérvix:
 - En el Hospital del Niño y la Mujer, la muestra fue tomada por la *Dra. Olimpia Porras* (jefe de la clínica de displasias).
 - En la consulta privada, la muestra fue tomada por el Dr. José Zermeño.
- Protocolo toma de muestra:
 - Consistió en tomar una citología del cuello del cérvix, con ayuda de un cytobrush, tal cual se hace con la toma del *papanicolaou*.
 - Posteriormente se colocó el cytobrush en un frasco esterilizado, con **PreservCyt**.
 - Una vez etiquetado, la muestra fue transportada en hieleras (4°), hasta el laboratorio de microbiología en la Facultad de Medicina, para su análisis

que consistió en la extracción del **ADN**, genotipificación del **VPH** y la expresión de ARNm de **E4**.

- Ambas muestras fueron tomadas el mismo día, en la consulta de la paciente.
- La muestra de cérvix fue tomada para el estudio. Posteriormente, las pacientes recibieron su tratamiento programado en su cita médica.

9.1 Cadena de custodia

Ambas muestras, cérvix y saliva, fueron recolectadas por la tesista (CGR), el mismo día de consulta tanto en el hospital como en el consultorio privado. Fueron colocadas en hieleras con geles congelantes, manteniendo una temperatura de 4°C y posteriormente transportadas por la tesista al laboratorio de microbiología para su almacenado y procesado. El traslado tomó 13 minutos del hospital al laboratorio y 5 minutos del consultorio privado al laboratorio.

- Tomando en cuenta que el estudio se realizó en dos unidades de salud, se acudió al hospital del niño y la mujer de lunes a viernes de 8:00 am a 12:00 pm.
- Para el consultorio privado, fue por días variados durante la semana, por lo que se tenía comunicación con el Dr. Zermeño para conocer qué días se iban a tomar muestras.

9.2 Procesamiento de las muestras de saliva y cérvix.

- Se tomó una alícuota de 200 μ l en un tubo eppendorf de 1.5ml para la extracción de ADN.
- La muestra restante se dividió en dos alícuotas, en crioviales y se almacenan a -80. Todo realizado en gabinete de bioseguridad tipo II.

9.2.1 Para las muestras de cérvix:

- Se realizó el empastillado de pellet celular de la siguiente manera:
- Se agitó vigorosamente la muestra en vórtex y se le retiró el cytobrush.
- Se tomaron 4 alícuotas de 1200 μ L en tubos eppendorf y se centrifugaron a 16000g por 10 min.
- Se decantó el PreservCyt y el pellet celular se almacenó a -80°C para la extracción de ADN y ARN.

9.3 Procesamiento de ADN

9.3.1 Método de extracción de ADN

- A los 200 microlitros de saliva y al pellet celular de las muestras de cérvix agregar:
 - 500 microlitros de Buffer de lisis
 - 50 microlitros de SDS al 10%
 - 20 microlitros de proteinasa K
- Vórtex 30 segundos.
- Incubar a 55°C /90'800 rpm.
- Añadir 199.2 ml de NaCl y mezclar por inversión manual.
- Centrifugar a 13200 rpm por 15 minutos.
- Recolectar el sobrenadante en tubo eppendorf de 1.5 ml estéril y etiquetado.
- Añadir 760U microlitros de Isopropanol concentrado, frío (almacenado a -20 C). Mezclar por inversión manual.
- Reposar a -20 C toda la noche.

- Centrifugar a 1320 rpm/10 min. Desechar el sobrenadante por decantación y secar la pastilla (ADN), invertido el tubo sobre papel absorbente por 5 minutos.
- Lavado. Agregar 500ul de etanol al 70% en agua desionizada estéril. Mezclar por inversión manual.
- Centrifugar a 10000 rpm/10 min. Desechar el sobrenadante por decantación y secar la pastilla (ADN), invertido el tubo sobre papel absorbente estéril hasta sequedad total. (15 a 20 minutos).
- Re suspender el DNA en 50 microlitros de TE. Almacenar en refrigeración (2 a 8 C) para realizar PCR.

9.4 Concentración y calidad del ADN para ambas muestras

- La calidad y concentración del ADN obtenido, se determinó empleando el equipo Nanodrop One de ThermoFisher Scientific, Espectrofotómetro.
- La concentración mínima requerida para llevar a cabo la reacción de amplificación es de 20 ng/μL.
- La pureza se evaluó con la relación de absorbancias A260/280 y 260/230, que indica que una muestra está libre de agentes contaminantes (solventes o proteínas). Se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor de absorbancia entre 1.8-2.0.

9.5 Detección y genotipificación de VPH

Se realizó mediante PCR tiempo real utilizando el kit Omega Plex VPH de Genes2Life, el cual realiza detección y genotipificación a la par. La técnica se describe en el inserto del Kit. [\(ANEXO\)](#)

9.6 Diseño de oligonucleótidos

Posteriormente se continuó trabajando en el diseño de oligonucleótidos para la cuantificación del ARNm. La cual se presenta a continuación.

HPV16 E4	NC_001526.4	HPV16 E4 Fw	GACGACTATCCAGCGACCAA	Length	Start	Stop
		HPV16 E4 Rv	ATGCAGTGAGGATTGGAGCA	107	2592	2691
HPV18 E4	NC_001526.4	HPV18 E4 Fw	ATGTGCAGTACCAAGTGACGA	Length	Start	Stop
		HPV18 E4 Rv	GAATACGGTGAGGGGGTGTG	77	3426	3502
HPV 33 E4	KU298894.1	HPV33 E4 Fw	GCTGACATACAGACAGACAA	Length	Start	Stop
		HPV33 Rv	CTACACACAGTCCGCTGCTT	182	3343	3505
HPV 58 E4	KY225935.1	HPV 58 E4 Fw	AAACTGCTGACCCAAAGACC	Length	Start	Stop
		HPV 58 E4 Rv	CTGTGTAGTCCTCCTCCTCGT	163	3375	3517

Tabla 2. Diseño de oligonucleótidos VPH 16, 18, 33 y 58

Se realizó la extracción de RNA de las muestras de saliva, la cual se realizó con el Kit Quick ADN/ARN Pathogen Miniprep, Zymo research. Obteniendo buena calidad y cantidad de ARN. Posteriormente se realizó el protocolo de ADNasa, se hizo la retro transcripción y posteriormente se obtuvo la cuantificación de cADN. De igual manera, la extracción de ARN de las muestras de cérvix, las cuales se realizaron con el kit de

Qiagen. Para posteriormente seguir trabajando con el protocolo de ADNasa, seguido de la retro transcripción.

9.7 Expresión del ARN mensajero de E4

La expresión del ARNm de E4 en las muestras de cérvix y saliva se realizó mediante PCR tiempo real con SYBR Green en el termociclador CFX96 de Biorad. Para la extracción de ARN de las muestras de saliva se utilizó el kit Quick-DNA/RNA Pathogen miniprep de Zymo ([ANEXO](#)) y para la extracción de ARN de las muestras de cérvix se utilizó el kit QIAmp Viral ARN de Qiagen ([ANEXO](#)). La calidad y concentración de cada ARN fue evaluado mediante espectrofotometría en el Nanodrop One de ThermoFisher Scientific. Posteriormente los ARN's fueron incubados con DNase I de Thermo Scientific (#EN0521). Al ARN libre de ADN se le realizó retrotranscripción con el kit RevertAid H Minus First Strand cADN de Thermo Scientific. La calidad y concentración del cADN se evaluó en el nanodrop, en base a una relación de absorbancia de 1.8/2.0

Se realizó la expresión de ARNm de E4 de los genotipos 16, 18, 33 y 58 con los siguientes oligonucleótidos:

- HPV16 E4 Fw: 5' GACGACTATCCAGCGACCAA 3'
- HPV16 E4 Rv: 5' ATGCAGTGAGGATTGGAGCA 3'
- HPV18 E4 Fw: 5' ATGTGCAGTACCAGTGACGA 3'
- HPV18 E4 Rv: 5' GAATACGGTGAGGGGGTGTG 3'.
- HPV33 E4 Fw 5' -GCTGACATACAGACAGACAA-3'
- HPV33 E4 Rv 5'-CTACACACAGTCCGCTGCTT-3'
- HPV58 E4 Fw 5'-AAACTGCTGACCCAAAGACC-3'
- HPV58 E4 Rv 5'-CTGTGTAGTCCTCCTTCCTCGT-3'

La qPCR se realizó usando Máxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2X) de Thermo Scientific. Se realizó a un volumen final de reacción de 12.5 μ L con los siguientes componentes: 1X de SYBR Green Mix, 0.3 μ M de cada oligonucleótido (forward y reverse) y 800 ng de cADN.. Con el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial a 95°C por 10 min, 40 ciclos de (desnaturalización a 95°C por 15 s, alineamiento a 60°C por 30 s y extensión a 72°C por 30 s).

La adquisición de datos se realizó durante el paso de extensión.

10. Calidad de las mediciones

En cada paso del proceso se realizaron acciones para validar los resultados obtenidos.

- Para el proceso de extracción de ADN junto con las muestras clínicas se realizó la extracción de controles. Como control negativo, se utilizó una muestra previamente detectada como VPH negativa y como control positivo, se utilizó células Hela. Se evaluó la calidad y concentración del ADN mediante espectrofotometría y se realizó PCR punto final de un gen constitutivo a todas las muestras. En todas obtuvimos la concentración y calidad ideal del ADN y amplificación del gen constitutivo.
- En cuanto a la detección y genotipificación del VPH por qPCR, además de los controles positivos y negativos incluidos en kit, se procesaron los controles de extracción.
- En relación con la expresión del ARN mensajero de E4, posterior a la extracción de ARN, se llevó a cabo un proceso con ADNasa. Se realizó la RT y la concentración y pureza del cADN obtenido fue evaluada por espectrofotometría. Para la qPCR, la medición se validará por medio de controles positivos y negativos en cada corrida.

11. Análisis estadístico

11.1 Análisis descriptivo

Se realizó análisis descriptivos de las variables, analizando la distribución por prueba de Shapiro-Wilk o la prueba gráfica de cuartil-cuartil. Las de distribución normal se presentó como media y desviación estándar o como mediana y rangos intercuartílicos cuando fue no normal. Las variables dicotómicas y/o categóricas se describieron como frecuencias y porcentajes.

11.2 Estadística inferencial

Para el contraste de las variables continuas entre las pacientes positivas y negativas a VPH, usamos t de student si siguieron una distribución normal y de lo contrario wilcoxon simple. Las variables categóricas se contrastaron a través de una chi cuadrada.

Se planteó realizar un análisis de correlación de Pearson si las dos variables analizadas hubieran tenido una distribución normal o correlación de Spearman en caso contrario.

El análisis estadístico se realizó con el programa R, versión 4.0.2

11.3 Variables en el estudio

Variable	Definición operacional	Tipo de variable	Unidades	Valores
Prot E4_C	Cuantificación por RT-PCR de los niveles de expresión del mensajero de proteína E4 en cérvix	Continua	Cq (número de ciclos en que la fluorescencia empieza a ser detectada)	>38
Prot E4_S	Cuantificación por RT-PCR de los niveles de expresión del mensajero de proteína E4 en saliva	Continua	Cq (número de ciclos en que la fluorescencia empieza a ser detectada)	>38
Tabaco	Consumo de tabaco	Catégorica dicotómica	Si No	1) Si 2) No
Consumo de tabaco	Número de cigarros consumidos al día.	Catégorica ordinal	a) Menor de 10 b) De 10 a 20 c) De 21 a 40 d) Mas de 41	a) 1 b) 2 c) 3 d) 4
Alcohol	Consumo de bebidas alcohólicas de manera social.	Catégorica Dicotómica	Si No	1) Si 2) No
Número de parejas sexuales	Número de parejas sexuales desde el inicio de la vida sexual hasta la fecha, de la paciente.	Catégorica ordinal	1) 1 a 3 parejas 2) 4 a 7 parejas De 8 a 10 parejas	1 - ∞
Edad	Tiempo que ha transcurrido desde el nacimiento de la paciente hasta la fecha.	Continua	Años	18-70

Tabla 3. Variables

11.4 Método de aleatorización

No aplica

11.5 Tamaño de la muestra

Dado que se desconocen los niveles de expresión de la proteína E4 en saliva, se realizó una prueba piloto; que de acuerdo con la recomendación de Browne RH, la cantidad mínima para comenzar a observar cómo se comporta la población , es de 30 individuos (41).

12. Aspectos éticos

12.1 Investigación con riesgo mínimo.

Su elaboración se basó en las normal nacionales e internacionales que establecen los principios éticos para la investigación en seres humanos como el Reglamento de la Ley General de Salud, la norma oficial mexicana NOM-012-SSA3-2012, la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humano y el protocolo de Estambul.

De acuerdo con el artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud en su título II, capítulo I, artículo 17, este estudio se consideró de riesgo mínimo, debido a que se realizó un procedimiento común de carácter poco invasivo y no se interferirá en el tratamiento de los pacientes.

La carta de consentimiento informado fue elaborada de acuerdo con los lineamientos previamente mencionados. El proceso de obtención del consentimiento informado se hizo conforme a las Guías de Buenas Prácticas clínicas, se informó a la paciente sobre el objetivo, justificación, beneficios y riesgos de participación del estudio, se aseguró que la suscrita en ejercicio de su libre voluntad, previa comprensión del estudio y sin la influencia de terceras personas y con la debida capacidad legal, otorgara su consentimiento.

El manejo de los datos que se obtuvieron fue realizado exclusivamente por los investigadores a cargo, manteniendo la confidencialidad de la información en todo momento.

En cuanto al manejo del material biológico, fue de acuerdo con la **NOM-087-ECOL-SSA1-2002**, sobre el manejo de RPBI.

Se anexa la carta de aceptación del comité académico de la Maestría en Ciencias en Investigación clínica, así como la carta de aceptación por parte de la Comisión de bioética de San Luis Potosí, Secretaría de Servicios de Salud (SSA) ([ANEXO](#)).

13. Plan de trabajo

1. Realización de la estrategia de búsqueda del tema.
2. Elaboración del protocolo de investigación.
3. Presentación del protocolo ante tutor y asesores.
4. Presentación del protocolo en seminarios.
5. Presentación del protocolo de investigación ante el Comité académico de la Maestría en Ciencias en Investigación Clínica. Se anexa carta de aprobación. [\(ANEXO\)](#)
6. Presentación del protocolo de Investigación ante la Comisión de bioética de San Luis Potosí, Secretaría de Servicios de Salud. (SSA) Se anexa carta de aprobación. [\(ANEXO\)](#)
7. Una vez aprobado por todos los comités de ética, se continuó con la captación de pacientes.
8. Se estableció el protocolo para la toma de muestra, en el Hospital del Niño y la Mujer por la Dra. Olimpia Porras y en el caso de la consulta privada por el Dr. José de Jesús Zermeño Nava. Las tomas de muestras de saliva fueron tomadas por la tesista.
9. Capacitación de la tesista, por parte de la Dra. Sofia Bernal, Dra. Úrsula Medina Moreno y M. en C. Sandra Mota para el procesamiento de las muestras y realización de PCR.
10. Para la obtención del *consentimiento informado* se realizó lo siguiente (Ver figura 6):
 - Paciente que acudió a la clínica de displasias del Hospital del Niño y la Mujer “Dr. Alberto López Hermosa”.
 - Paciente que acudió a consulta privada con el Dr. José de Jesús Zermeño Nava.
 - Se les invitó a participar en el estudio a aquellas pacientes que fueran candidatas.
 - Se explicó y posteriormente se firmó el consentimiento informado.

- En la misma cita:
 - a) Se obtuvieron los datos de la paciente a través del llenado de la hoja de recolección de datos [\(ANEXO\)](#)
 - b) Se tomó la muestra de cérvix
 - c) Se tomó la muestra de saliva

11. Análisis de las muestras de cérvix y saliva mediante PCR. [\(ANEXO\)](#)

12. Análisis estadístico de los datos obtenidos.

13. Redacción de tesis.

14. Presentación de la defensa de grado.

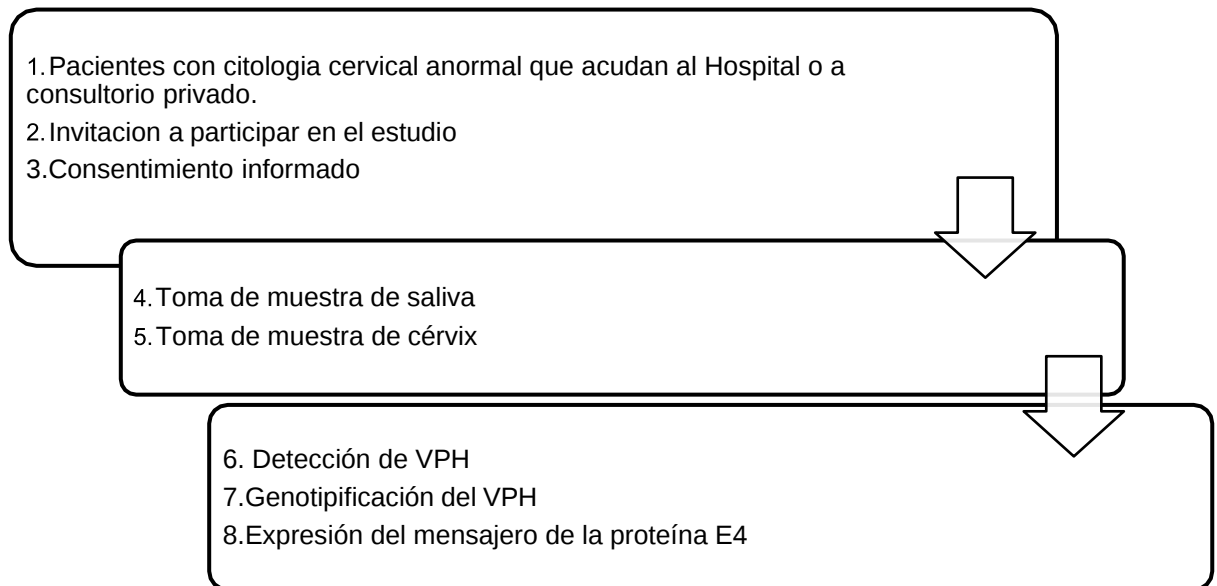


Figura 3. Plan de trabajo esquematizado

14. Recursos

14.1 Recursos humanos y actividades

- Recursos humanos: Investigadores y tesista
- *Acciones de los investigadores involucrados:*
- **Directora de tesis:** Dra. Úrsula Medina Moreno
- Responsable del Laboratorio de Investigación Traslacional en Farmacología.
- **Codirectora de tesis:** Dra. Sofia Bernal Silva
- **Asesores clínicos:** Dr. Antonio Briseño Sainz y Dr. José de Jesús Zermeño Nava.
- **Asesores Metodológicos:** Dr. Mauricio Pierdant Pérez, M. en C. Sandra Cadena Mota
- **Colaborador:** Dra. Olimpia Porras (Encargada de la toma de las muestras de cérvix en el hospital)
- **Tesista:** Celina García Ramos
- Encargada de la toma de las muestras de saliva.

14.2 Recursos materiales:

- Reactivos para PCR
- Kit OmegaPlex de Genes2Life
- Kit Quick-DNA/RNA Pathogen miniprep. Zymo research.
- Kit QIAmp Viral RNA. Qiagen
- AmplitaqGold de Applied Biosystems
- Frascos para la recolección de muestras
- Cytobrushs desechables
- Preservcyt
- Hielera térmica
- Guantes de látex / nitrilo
- Equipo de protección personal
- Computadora
- Impresora
- Termociclador Labnet International TC9610 MultiGene OptiMax Thermal Cycler, 115V
- Fotodocumentador Axygen Gel Documentation System
- Termociclador tiempo real modelo CFX96 marca Bio rad
- Nanodrop One de Thermofisher Scientific, Espectrofotómetro

15. Capacitación de personal

Capacitación de personal: Se contó con personal capacitado.

La capacitación del maestrante para el procesamiento de las muestras fue por parte de la M. en C. Sandra Cadena Mota, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UASLP. La cual se llevó a cabo del mes de mayo 2021 a septiembre del mismo año, en un horario de 9:00 am – 1:00 pm de lunes a viernes.

16. Financiamiento:

Fue cubierto por recursos propios del Laboratorio de Investigación Traslacional En Farmacología y del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UASLP, así como de la Beca CONACYT(671957) de la alumna de la Maestría en Ciencias en Investigación clínica, Celina García Ramos.

17. Resultados

Durante el periodo de febrero-abril 2022 se obtuvo un total de 88 participantes cada una con sus dos muestras (cérvix y saliva). Debido a la necesidad de tener al menos 30 pacientes con positividad a VPH, se decidió reclutar al menos el doble de pacientes sospechosas provenientes de los respectivos centros, para poder alcanzar el tamaño de muestra piloto. De las cuales 62 fueron del Hospital del niño y la mujer y 26 muestras del consultorio del Dr. Zermeño. **(Figura 4.)**

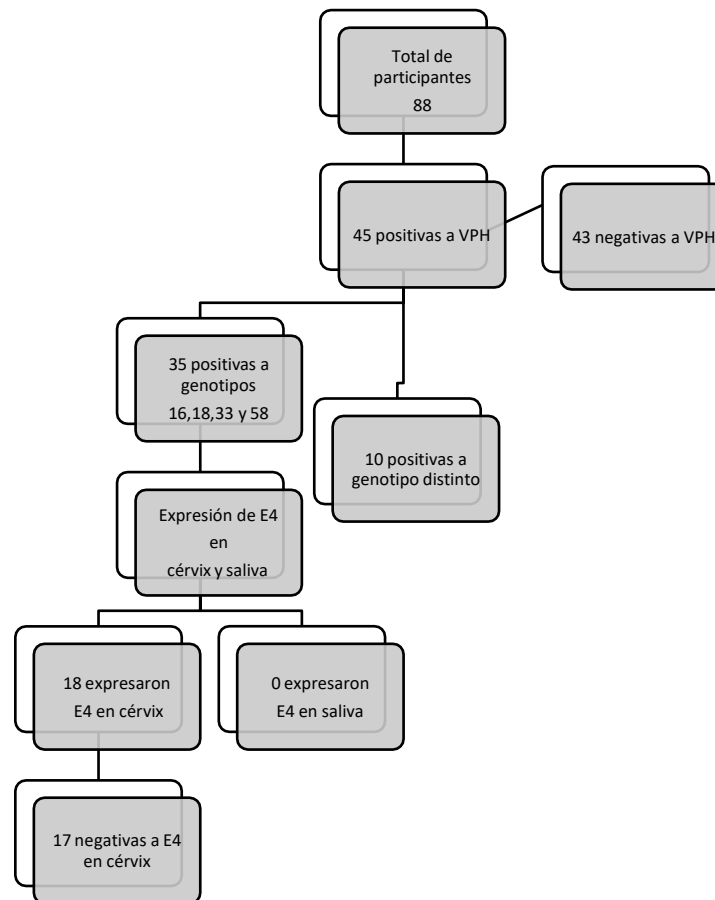


Figura 4. Flujograma de participantes en el estudio

	VPH NEGATIVAS (N=43)	VPH POSITIVAS (N=45)	TOTAL (N=88)	Valor de P
Edad `	38.0 (10.3)	38.3 (10.9)	38.2 (10.6)	P= 0.226 *
Tabaquismo				
<i>Si consume</i>	11 (25.6%)	13 (28.9%)	24 (27.3%)	P=0.727-
<i>No consume</i>	32 (74.4%)	32 (71.1%)	64 (72.7%)	
Consumo de tabaco				
<i>Menos de 10 cigarros al día</i>	10(90.9%)	12 (92.3%)	22 (91.6%)	P=0.712-
<i>10 a 20 cigarros al día</i>	0	1 (7.7%)	1 (4.2%)	
<i>21 a 40 cigarros al día</i>	1(9.1%)	0	1 (4.2%)	
Alcohol				
<i>Si consume</i>	20 (46.5%)	23 (51.1%)	43 (48.9%)	P=0.666-
<i>No consume</i>	23 (53.5%)	22 (48.9%)	45 (51.1%)	

*t de student - Chi cuadrada ~ Wilkoxon
` media +/- desviación estándar

Tabla 4. Datos descriptivos de la población total del estudio

La media de edad de la población total fue de 38.2 años. Aquellas que resultaron positivas a VPH, su media de edad fue de 38.3. Se obtuvieron datos sobre los hábitos perniciosos que presentaban las participantes, el 72.7% negó el consumo de tabaco mientras que el 27.3% fue positivo a tabaquismo. El consumo reportado más frecuente fue de menos de 10 cigarros al día. Para el consumo de alcohol, el 51.1% negó su consumo.

Mientras que para el grupo de pacientes negativas a VPH, el 74.4% negó el consumo de tabaco al igual que el 53.5% para el hábito de alcohol.

	VPH NEGATIVAS (N=43)	VPH POSITIVAS (N=45)	TOTAL (N=88)	Valor de P
Ultimo papanicolaou				
Menos de 6 meses	34 (79.1%)	31(68.9%)	65 (73.9%)	P= 0.237 -
Más de 6 meses a 1 año	1 (2.3%)	5 (11.1%)	6(6.8%)	
Más de 1 año	8 (18.6%)	7 (15.6%)	15 (17%)	
No reportado	0 (0%)	2 (4.4%)	2 (2.3%)	
Inicio de vida sexual				
Mediana	18.0 (12.0,33.0)	18.0 (13.0,26.0)	18.0 (12.0,33.0)	P=0.634 ~
Número de parejas sexuales				
De 1 a 3 parejas	31 (72.1%)	36 (80.0%)	67 (76.1%)	P=0.161-
De 4 a 7 parejas	12 (27.9%)	7 (15.6%)	19 (21.6%)	
De 8 a 10 parejas	0 (0%)	2 (4.4%)	2 (2.3%)	
Diagnóstico previo				
ASCUS	1 (2.3%)	0 (0%)	1(1.1%)	P=0.1579 -
Cervicitis	0 (0%)	1 (2.2%)	1 (1.1%)	
NIC 1	26 (60.5%)	30(66.7%)	56 (63.6%)	
NIC 2	0 (0%)	1 (2.2%)	1(1.1%)	
NIC 3	0 (0%)	1(2.2%)	1(1.1%)	
Lesión sospechosa por VPH	3 (7.0%)	6(13.3%)	9(10.2%)	
No reportado	13 (30.2%)	6(13.3%)	19(21.6%)	
*t de student - Chi cuadrada ~ Wilcoxon				
ASCUS- células escamosas atípicas de significado indeterminado				

*t de student - Chi cuadrada ~ Wilkoxon

ASCUS- células escamosas atípicas de significado indeterminado

Tabla 5. Variables descriptivas sobre factores de riesgo para infección por VPH

Se estudiaron las variables que son factores de riesgo para la infección, la cuales se compararon para identificar si existen diferencias entre aquellas que fueron VPH positivas vs VPH negativas.

Se obtuvieron los datos sobre los principales factores de riesgo para infección por VPH. El 73.9% del total de la población, informó que su ultimo papanicolaou fue hace menos de 6 meses al momento del interrogatorio y el 17% tenían más de un año sin realizarlo. Al momento del interrogatorio el 76.1% de las pacientes mencionó tener de 1 a 3 parejas sexuales y únicamente el 2.3% entre 8 y 10 parejas sexuales durante su vida.

Se recabó el dato de diagnóstico previo, del expediente clínico de las pacientes. Observamos que el 63.6% del total de las pacientes presentaron neoplasia intraepitelial cervical (NIC) 1 y para NIC 2 y NIC 3, el 1.1%. Dentro del grupo de las pacientes que resultaron positivas a VPH, de igual manera la mayoría, con un 66.7%, presentó el diagnóstico previo de NIC 1.

El análisis de las muestras se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología de la facultad de medicina, el cuál comenzó con la extracción de ADN del total de las muestras obtenidas (88) tanto de cérvix como de saliva. Posterior a esto, se realizó la cuantificación de ADN en el nanodrop con la finalidad de evaluar la concentración y calidad de ADN. Todas las muestras tuvieron buena concentración y calidad.

Se continuó con una PCR punto final de un gen constitutivo para evaluar calidad del ADN y que no existieran inhibidores de la PCR. Como resultado de esto obtuvimos que todas las muestras amplificaron. **(Figura 5.)**

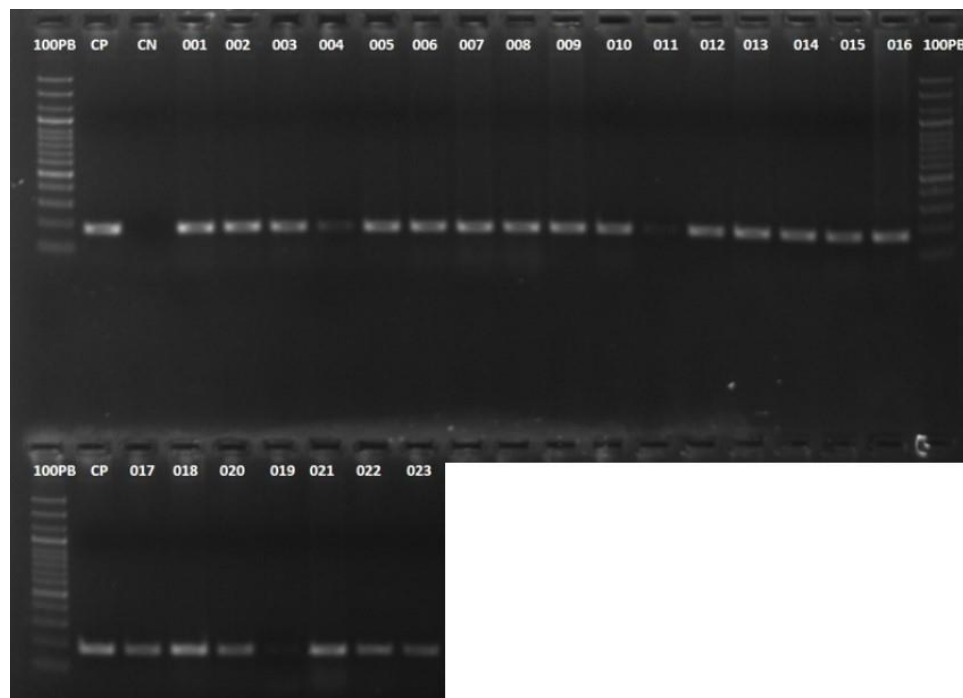
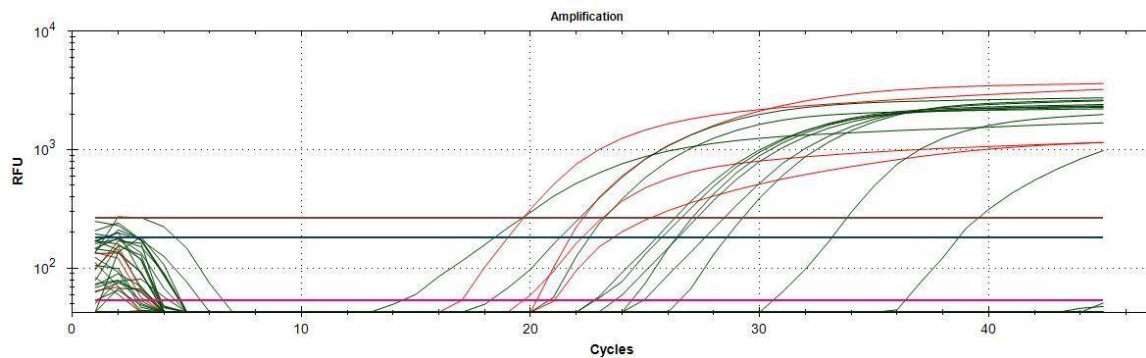


Figura 5. Imagen representativa de la amplificación de la PCR punto final con gen constitutivo.

Posteriormente, se realizó la detección y genotipificación con el kit omega plex, el cual se basa en la detección de genotipos de alto riesgo. Del total de las pacientes (88), 43 resultaron negativas y 45 positivas a VPH. En la tabla 4 y 5, se presentan las características descriptivas de ambos grupos, donde no se encontraron diferencias significativas entre estos. **(Figura 6.)**

A)



B)

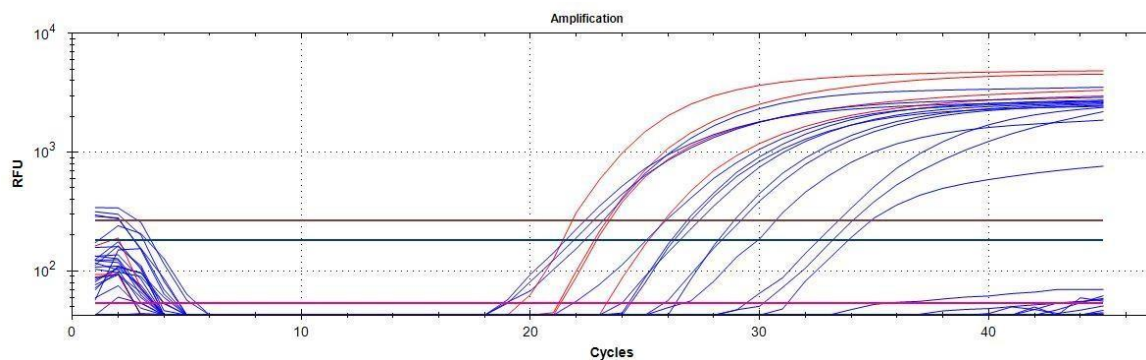


Figura 6. Imágenes representativas de la detección y genotipificación de VPH de alto riesgo con el kit Ω -Plex VPH de Gene2Life

Como podemos observar en **A)** primera reacción, se realizó la detección de los genotipos 16, 56 y 31, 35, 45, 51, 73, 82. En color rojo se muestra la amplificación del control positivo y en color verde la de las muestras. En **B)** segunda reacción, en la cual se hizo

la detección de los genotipos 54, 18 y 33, 39, 52, 58, 59, 68. En color rojo se muestra la amplificación del control positivo y en color azul la de las muestras.

De las 45 muestras positivas con VPH, se incluyeron únicamente las muestras que habían dado positivo para el pool que incluían los genotipos de interés del estudio (16, 18, y pool 33,58), obteniendo un total de 35 muestras. Descartando entonces aquellas que resultaron negativas a VPH y a genotipos distintos.

Genotipos	Total 45
VPH 16	5(5.7%)
VPH 16+VPH 31 (pool)+VPH 33(pool)	1(1.1%)
VPH 16+VPH 31 (pool)	1(1.1%)
VPH 18	8(9.1%)
VPH 31 (pool)	8(9.1%)
VPH 33 (pool)	18 (20.5%)
VPH 33 (pool)+VHP 31(pool)	1(1.1%)
VPH 56	2(2.3%)
VPH 56+ VPH 33(pool)	1(1.1%)

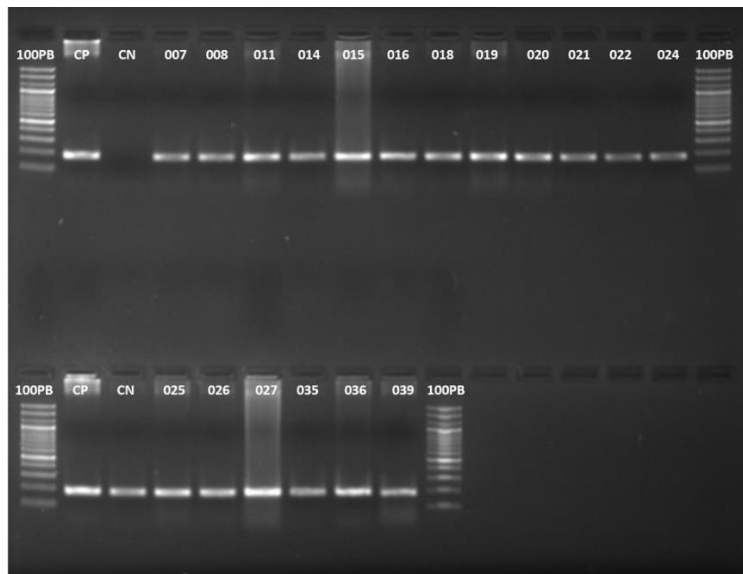
Tabla 6. Genotipos de alto riesgo en paciente que fueron positivas a VPH

En la tabla 6 se reporta el total de las muestras positivas a los diferentes genotipos de alto riesgo. Donde se puede observar que el genotipo más prevalente dentro de nuestra población fue el pool del genotipo 33 con un 20.5%, seguido del pool del genotipo 31 con un 9.1% al igual que el genotipo 18 con un 9.1%.

Se continuó trabajando con las 35 muestras para realizar la expresión de la proteína E4. Comenzando nuevamente con la extracción de ARN para cérvix se utilizó el kit de Qiagen y en saliva utilizando el kit de Zymo.

Posteriormente se hizo la cuantificación de ARN obteniendo buena concentración y calidad de ARN. Después de esto se realizó ADNasa para eliminar en su totalidad ADN y asegurarnos que solo estuviera el ARN presente. Una vez hecho esto, se procedió a realizar la retro transcripción para cuantificar finalmente el cADN.

A)



B)

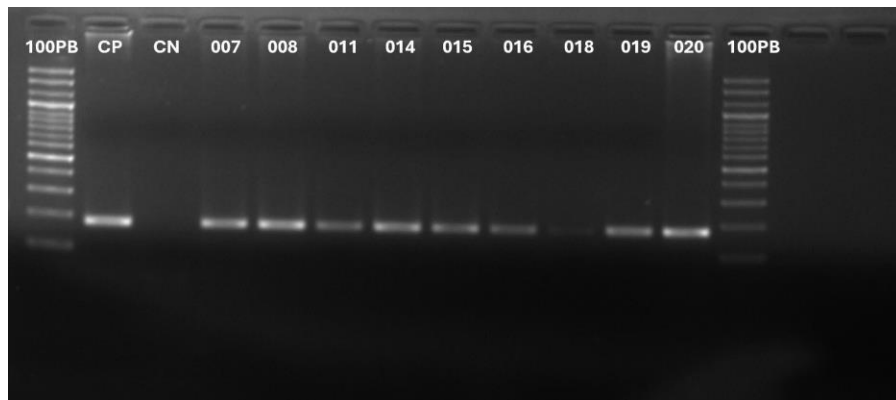
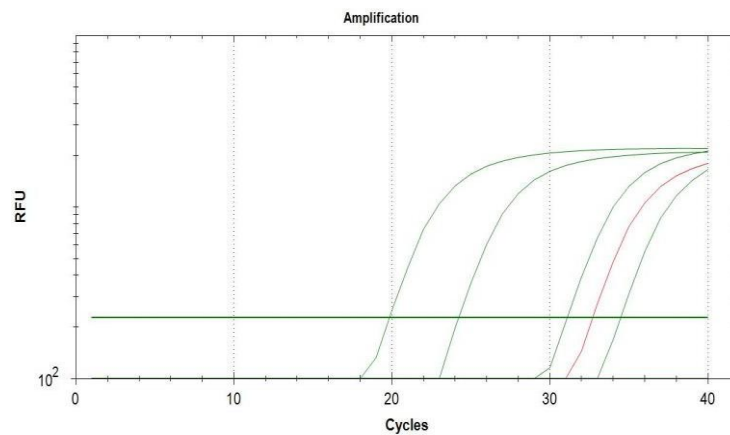


Figura 7. Imágenes representativas de amplificación de la PCR cADN cervix (A) y cADN saliva (B)

Finalmente se realizó la expresión del ARN mensajero de E4 para VPH 16, 18, 33 y 58 mediante PCR tiempo real. Se observó que 18 amplificaron en cervix, siendo positivas a la expresión de E4, así mismo un grupo de 17 muestras no amplificaron. Como podemos observar en la figura 9, se presenta un ejemplo del análisis de expresión del ARN mensajero de E4. En rojo se muestra la amplificación del control positivo al ciclo 31 y en verde la amplificación de las muestras las cuales fueron positivas desde el ciclo 18.

A)



B)

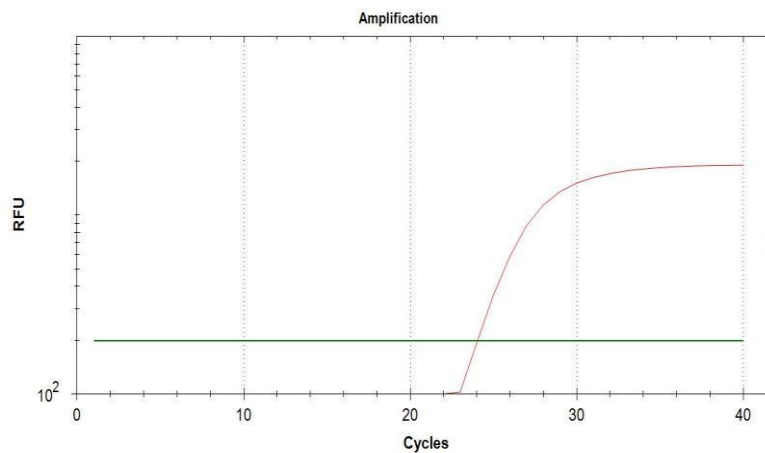
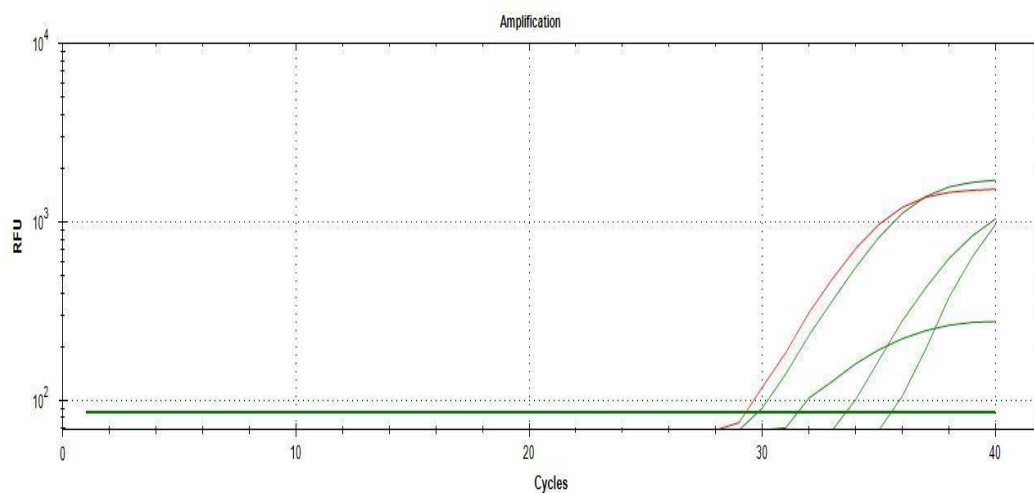


Figura 8. Imagen representativa de la amplificación del ARNm de E4 para VPH16

A) muestras de cervix y **B)** muestras de saliva. En rojo se muestra la amplificación del control positivo a partir del ciclo 31 y en verde la amplificación de las muestras a partir del ciclo 18.

A)



B)

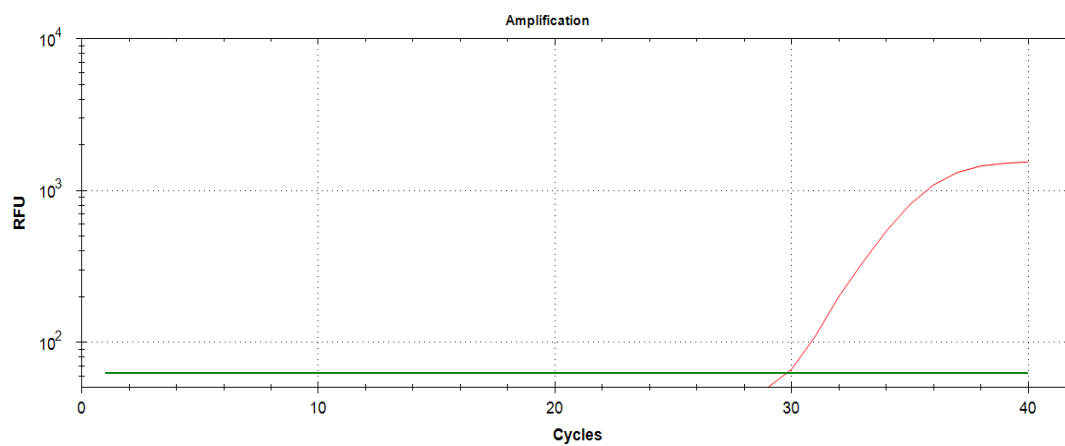
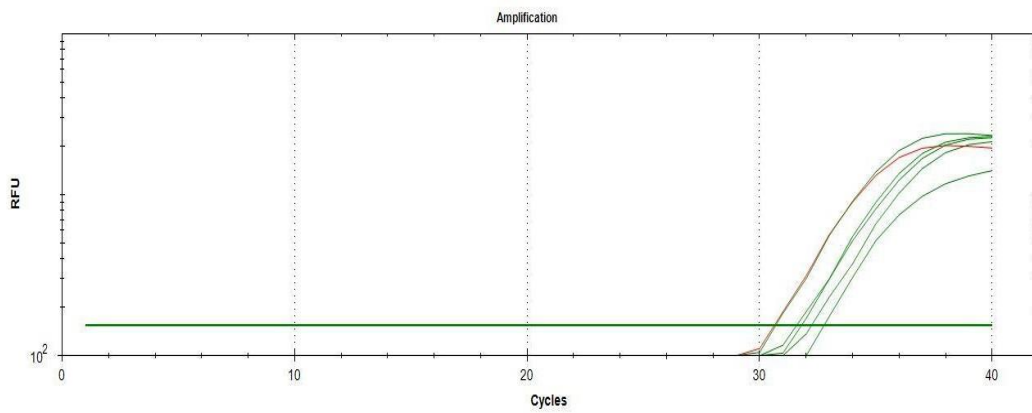


Figura 9. Imágenes de la amplificación del ARNm de E4 para VPH 18.

A) muestras de cérvix y **B)** muestras de saliva. En rojo se muestra la amplificación del control positivo y en verde la amplificación de las muestras.

A)



B)

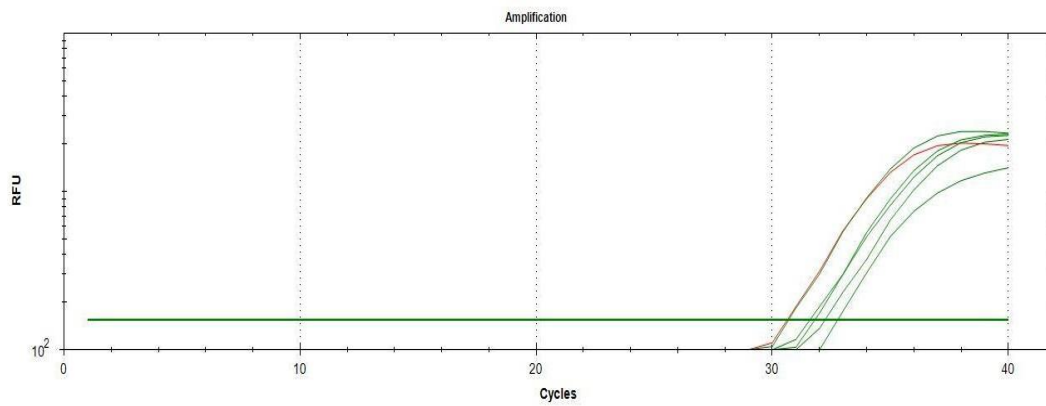


Figura 10. Imagen de la amplificación del ARNm de E4 en cérvix para A) VPH 33, B) VPH 58.

En rojo se muestra la amplificación del control positivo y en verde la amplificación de las muestras.

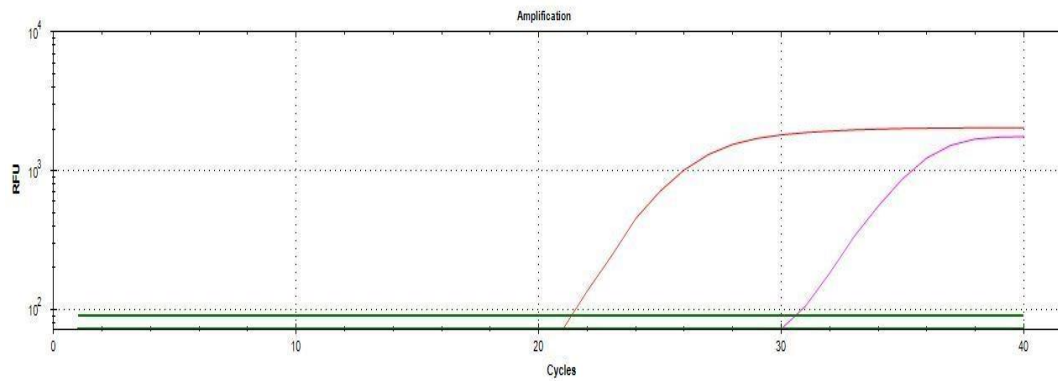


Figura 11. Amplificación del ARNm de E4 en saliva para VPH 33 y VPH 58.

En rojo se muestra la amplificación de control positivo de VPH 33 y en rosa la amplificación del control positivo de VPH 58.

	Expresión positiva de E4 en cérvix (18)	Expresión negativa de E4 en cérvix (17)	Total: 35	Valor de P	
Edad	37.2 (10.5)	41.8 (11.7)	39.4 (11.2)	P=0.69	*
Ultimo papanicolaou					
Menos de 6 meses	13 (72.2%)	10 (58.8%)	23 (65.7%)	P=0.230	-
Más de 6 meses	1 (5.6%)	4 (23.5%)	5 (14.3%)		
menos de 1 año	4 (22.2%)	1 (5.9%)	5 (14.3%)		
Más de 1 año	0 (0%)	2 (11.8%)	2 (5.7%)		
No reportado					
Inicio de vida sexual					
Mediana	18.5 (15.0,26.0)	18.0 (13.0,26.0)	18.0 (13.0,26.0)	P=0.2619	~
Número de parejas sexuales					
De 1 a 3 parejas	16 (88.9%)	15 (88.2%)	31 (88.6%)	P=0.512	-
De 4 a 7 parejas	2 (11.1%)	1 (5.9%)	3 (8.6%)		
De 7 a 10 parejas	0 (0%)	1 (5.9%)	1 (2.9%)		
Tabaquismo					
Si consume	5 (27.8%)	4 (23.5%)	9 (25.7%)	P=0.74	-
No consume	13 (72.2%)	13 (76.5%)	26 (74.3%)		
Consumo de tabaco					
Menos de 10 cigarros al día					
10 a 20 cigarros al día	0	0	0		
21 a 40 cigarros al día	0		0		
Alcohol					
Si consume	11 (61.1%)		18 (51.4%)		
No consume	7 (38.9%)	10 (58.8%)	17 (48.6%)		
Diagnóstico previo					
ASCUS	0	0	0	P=0.61	-
Cervicitis	0 (0%)	1 (5.9%)	1 (2.9%)		
NIC 1	14 (77.8%)	11 (64.7%)	25 (71.4%)		
NIC 2	1 (5.6%)	0 (0%)	1 (2.9%)		
NIC 3	0 (0%)	1 (5.9%)	1 (2.9%)		
Lesión sospechosa por VPH	1 (5.6%)	1 (5.9%)	2(5.7%)		
No reportado	2 (11.1%)	3 (17.6%)	5 (14.3%)		

*t de student - Chi cuadrada ~ Wilkoxon

` media +- desviación estándar

Tabla 7. Amplificación de la expresión de ARN mensajero de la proteína E4, en aquellas pacientes positivas a los genotipos de interés (16,18,33 y 58)

De las 18 muestras que amplificaron se puede observar que la media de edad fue de 37.2 años. De las cuales el 72.2% reportó que su último papanicolaou fue hace menos de 6 meses.

Para los factores de riesgo dentro de este grupo, el 88.9% indicó que tenían de 1 a 3 parejas sexuales hasta el momento del interrogatorio. Dentro de los hábitos perniciosos, el 72.2% negó el consumo de tabaco, donde el consumo predilecto fue de 10 cigarros al día y de manera contraria el consumo de alcohol fue positivo en el 61.1%.

Para el diagnóstico previo que tenían las pacientes, la mayoría presentaba NIC 1. Dentro del grupo de positivas para la amplificación de la proteína E4, el 77.8% presentaba este diagnóstico. La minoría con un diagnóstico de VPH y NIC 2.

Se realizó el análisis comparativo de ambos grupos, donde observamos que no hay diferencias significativas.

18. Discusión

El objetivo de este estudio era correlacionar la expresión del ARN mensajero de la proteína E4 en cérvix y en saliva. Siendo estos dos sitios anatómicos los que se ven principalmente afectados por la infección de VPH y esto debido a su tropismo. Además de tomar en cuenta que la infección por este virus es una enfermedad de transmisión sexual por lo que las prácticas sexuales de riesgo son factores causales para poder contraer VPH y presentarlos en ambos sitios.

Contrario a nuestra hipótesis, donde se apostaba encontrar la expresión en ambos sitios, de 35 muestras únicamente 18 amplificaron para la proteína E4 en cérvix. Lo que nos hace cuestionar ¿por qué en saliva ninguna muestra amplificó? Siendo que este sitio anatómico cuenta con las características ideales para poder presentar una infección por VPH y además que se ha descrito la presencia del virus en cavidad oral teniendo un papel etiológico en el desarrollo de cáncer oral. Nuestro estudio planteaba la posibilidad de encontrar la proteína en E4 en cavidad oral como consecuencia de factores de riesgo que se describen en la literatura, los cuales están enfocadas en las prácticas sexuales de riesgo, así como el número de parejas sexuales y su prevalencia entre la población de adultos jóvenes.

La interrogante del porque no amplificó se inclina hacia el método de recolección utilizado. El muestreo de saliva fue recolectando saliva en un frasco estéril, pidiéndoles a las pacientes recolectar saliva en él, esto debido a la facilidad de muestreo que ofrecía este método. Stankiewicz y cols, 2012 menciona que los diversos métodos de muestreo de cavidad oral incluyen el enjuague bucal con solución salina, recolecta de saliva no estimulada, hisopados y cepillados orofaríngeos. Sin embargo, son métodos de recolección que no se encuentran estandarizados (41).

Seguido por el hecho de que verdaderamente no exista una infección en los dos sitios anatómicos simultáneamente. Descartando así, la posibilidad de tener un tamizaje menos invasivo y con mayor facilidad de muestreo. Aún cuando la literatura ha establecido el comportamiento sexual que incluyen múltiples parejas sexuales y/o

parejas sexuales con antecedente de infección por VPH y prácticas sexuales de riesgo que incluyen el sexo oral.

Guglielmo y cols. 2012, realizaron un estudio donde su objetivo era detectar la presencia de VPH en boca y en cérvix. La toma de muestra en cavidad oral fue por medio de hisopado con ayuda de cytobrush al igual que en cérvix. Como resultaron obtuvieron que el 48.33% de su población (60 pacientes) presentaba VPH en boca y el 73.3% presentaba la infección en cérvix. Tipificaron las muestras y encontraron que el genotipo más prevalente fue el 6, el cual es de bajo riesgo seguido por el genotipo 11, y los genotipos de alto riesgo 16,18 y 33, al igual que en nuestro estudio. Ellos sugieren que la frecuencia de VPH es más alta en cérvix debido a características de la mucosa cervical que no comparte con la mucosa oral y a la vez discuten que la infección genital no sea un factor predisponente para la infección oral (32).

En 2017, Cab-Sanchez y cols., publicaron un estudio con población de Mérida, Yucatán, México. Donde incluyeron 102 participantes entre 18 y 26 años, sin patología oral, con el objetivo de conocer la epidemiología del VPH oral. Se recolectaron muestras de diferentes sitios en cavidad oral a manera de hisopado. El genotipo más prevalente fue el 13, dentro de su población. Uno de los datos relevantes es que aquellos sujetos positivos a VPH, en un periodo de 6 meses eliminaron la infección. Tomando este dato que es relevante para nuestro estudio, ya que una infección puede resolver en un periodo corto lo que nos hace inferir que el tiempo transcurrido entre diagnóstico y toma de muestra es importante para observar o no la expresión de la proteína (42).

Ya que es una proteína que se encarga de alterar la red de citoqueratinas de las células epiteliales, lo que conlleva a que se vuelvan un blanco fácil para la liberación del genoma viral. Tomando en cuenta su expresión en etapas iniciales de la infección por VPH. Nos lleva a pensar que las muestras de saliva no amplificaron para la expresión de E4 probablemente porque no se encontraban en un estado inicial o activo (43).

En cérvix, aquellas muestras que amplificaron, 14 de ellas presentaban el diagnóstico de NIC 1, previo a la toma de muestra para el estudio. Por lo que podemos inferir que se

encontraban en un proceso activo de la infección. En contraste con las que no amplificaron en cérvix, nos orienta a pensar que puede ser por una cantidad baja de partículas virales, esto debido a que la infección podría estar entrando en una etapa de latencia.

Entendiendo que una infección activa se da cuando el VPH infecta las células epiteliales y así el genoma viral se encuentra amplificando y a su vez formando nuevas partículas virales que se alojan en los diferentes estratos del epitelio infectado (44).

Infiriendo que, a menor cantidad de partículas virales, el VPH probablemente se encuentre entrando en un periodo de latencia y por lo tanto no se encuentre amplificando.

Hasta la fecha, pocos estudios se han realizado con el fin de emplear la proteína E4 como biomarcador de un proceso activo de VPH. Aunado a esto, no hay estudios que plantearan la correlación en ambos sitios anatómicos, buscando la expresión de la proteína. La mayoría de los estudios relacionados muestran interés por E6 y E7, sin embargo, creemos oportuno ampliar el panorama de las demás proteínas de este virus, las cuales cada una toman papeles importantes en el ciclo viral.

En el año 2007, se realizó un estudio cuyo objetivo era encontrar anticuerpos para E4 y E7 del VPH, en soldados mexicanos. El tamaño de muestra fue de 288 pacientes masculinos, a los cuales se les tomaron muestras de sangre y muestras del pene y uretra distal con ayuda de un cytobrush. De sus resultados, los que son relevantes para comparar con nuestro estudio, es el dato de que el 13 % (36/288) fueron positivos para los anticuerpos E4. En nuestro estudio obtuvimos que el 51.42% fue positivo a la expresión de E4 (45).

En el 2020, Leemnas y cols. Publicaron un estudio que buscó la expresión de p15 y de E4 en biopsias cervicales. Su población fueron 538 mujeres que acudieron a una clínica de colposcopia en Barcelona, España. De las cuales recabaron muestras cervicales a manera de citología. Ellos reportan haber encontrado la positividad de E4 en el 40% de las muestras con un diagnóstico de NIC1, disminuyendo hasta un 22% en NIC 2 y 3% en

NIC3 y ausente en aquellas con cáncer. Este estudio describe a NIC 1 y NIC 2 como grupo de lesiones heterogéneas y complejas que se encuentran expresando E4 debido a una infección activa por VPH. Comparando nuestros resultados con los resultados de Leeman y cols 2020, podemos concordar en que la proteína E4 se está expresando en aquellas muestras con un diagnóstico de NIC 1, tal cual fue nuestro caso (46).

Otro resultado que toma relevancia y que se encuentra relacionado con esta expresión de la proteína, es el diagnóstico previo con el que contaban las pacientes en su expediente clínico antes de ingresar a nuestro estudio. La mayoría de nuestra población presentaba NIC 1. Sin embargo, llama la atención que el 60.5% del total de nuestra población, aun con diagnóstico de NIC1, fueron negativas para la infección por VPH.

Xiangwei y cols., en el 2021 publicaron un estudio correlacionando las infecciones por VPH de genotipos de alto riesgo, lesiones premalignas y cáncer cervical. Dentro de sus resultados, resulta interesante el dato de que aquellos con diagnóstico de NIC 1, el 59.73% resultó positivo. Aunque es la mayoría, podemos resaltar que el 40.27% negativo para VPH aún sigue siendo un porcentaje alto, aun cuando contaban con un diagnóstico de NIC. Un dato que resulta igual a los resultados observados en nuestro estudio, en cuanto al diagnóstico previo con el que contaban las pacientes y la positividad a VPH (47).

Esto, nos hace inferir que el intervalo de tiempo entre el resultado anormal de la citología cervical y la toma de muestra para nuestro estudio probablemente fue el necesario para que el sistema inmune eliminara la infección. Se dice que aproximadamente el 90% de las mujeres presenta una eliminación de las infecciones por VPH, esto en un periodo de tiempo entre 6 y 18 meses (48).

Un hallazgo importante del estudio fue la prevalencia de los genotipos de alto riesgo en nuestra población. (16,18,33 y 58). El 16 y 18 se encuentran ya establecidos como los genotipos oncogénicos más prevalentes en diferentes poblaciones del mundo, incluida la población mexicana. Sin embargo, nuestra población tuvo un alto porcentaje de la

presencia del pool con el genotipo 33. Esto toma relevancia por que indica el cambio de los genotipos de alto riesgo en nuestro estado, San Luis Potosí.

Revilla y cols., en el 2008 publicaron la prevalencia de los genotipos de alto riesgo circulantes en San Luis Potosí y Guanajuato. Los cuales fueron el 16, 31,35,52, 18,33 y 58. En una muestra de 442 mujeres con neoplasia intraepitelial cervical y carcinoma invasor (49).

De la Rosa y cols. en el 2016, publicaron resultados en cuanto a la prevalencia de genotipos de alto riesgo, en San Luis Potosí. Donde su tamaño muestral fue de 700 mujeres con diagnóstico de ASCUS, lesiones de bajo grado, lesiones de alto grado o cáncer cervical invasivo. De las cuales el 67% resulto con detección de VPH, el 63% con genotipos de alto riesgo de los cuales los más prevalentes fue el 33 (33%), 16 (16.6%) , 18 y 51 (6.7% cada uno) (50).

Acosta-Escalante y cols. en 2021, realizaron un estudio de prevalencia de genotipos en la población de Culiacán, Sinaloa (México), reportaron 56 pacientes con condilomas acuminados en área genital, a las cuales se les tomó citología cervical. Utilizando al igual que en nuestro estudio, pools para genotipos de alto riesgo. Como resultado ellos obtuvieron que aquellos más prevalentes fueron 31,33,35,52,58 con un 57.7 %, seguido por el VPH 16 con un 42.3% (51).

Esto a su vez hace énfasis en las vacunas ya existentes en nuestro país. La vacuna bivalente y cuadrivalente (Gardasil), intervención que fue efectiva para el control de la infección por VPH. Ambas previenen la infección por genotipos 16 y 18. Sin embargo, debido al cambio de genotipos prevalentes en la población por zona geográfica del país, las vacunas antes mencionadas no son suficientes para el resto de los genotipos de alto riesgo. En la actualidad, la vacuna 9va Valente, que incluye los genotipos 31/33/45/52/58, ya se encuentra en México (52).

Cabe resaltar la importancia de vigilar las variaciones de genotipos no vacunales que se presentan en las distintas regiones geográficas de nuestro país y establecer medidas preventivas con el fin de reducir la incidencia de cáncer cervicouterino. Además, sería interesante estudiar los cambios epidemiológicos del VPH y el impacto de la vacunación en diferentes poblaciones del país.

Aunque nuestro estudio no estaba diseñado para determinar los factores de riesgo como tabaco y alcohol, ya que no contábamos con el tamaño muestral ideal. Pudimos observar que en nuestra población no tomó relevancia ya que la mayoría negó el consumo. Sin embargo, la literatura enlista estos hábitos perniciosos como factores de riesgo para la progresión a cáncer.

Además, es importante mencionar que no se puede descartar que exista un sesgo de memoria el cual es común cuando se recolecta la información mediante un cuestionario, como fue nuestro caso. En cuanto a la variable de número de parejas sexuales también se pudo ver sesgada de igual manera.

18.1 Limitaciones del estudio

Es importante tomar en cuenta las limitaciones del estudio, comenzando con que el estudio se inició en plena era COVID-19, lo cual retrasó la recolección de muestras como se tenía contemplado en el plan de trabajo

Hacer énfasis en que las tomas de muestra de cérvix son operador dependiente, así como la toma de muestra de saliva.

Esto a manera de perspectiva puede ser estandarizada, con el fin de realizar un comparativo entre la calidad y cantidad del material genético recolectada entre cada técnica.

18.2 Fortalezas del estudio

Finalmente, a pesar de que los resultados no fueron los esperados, en cuanto a la expresión de la proteína E4 en ambos sitios anatómicos, nuestros resultados contribuyen a la importancia de seguir investigando la proteína E4 como biomarcador en infecciones activas de VPH, lo que nos lleva a tener la posibilidad de realizar un diagnóstico en etapas tempranas.

Lo ideal sería incluir pacientes con los diferentes diagnósticos para observar las diferencias de la expresión de E4 y donde podríamos encontrar mayor cantidad de partículas virales.

Otro resultado favorable del estudio es el resultado que se obtuvo sobre la prevalencia de los genotipos de alto riesgo distintos a los ya reportados.

Se contó con un equipo altamente capacitado para la elaboración de este protocolo, así como para el análisis de las muestras

18.3 Perspectivas

Derivado de los cambios en los genotipos de alto riesgo en nuestra población, es necesario calcular tamaños muestrales adecuados para corroborar si la expresión de E4 puede cambiar dependiendo de la etapa de infección o lesión cervical.

19. Conclusiones

Se observaron muestras en cérvix que expresaron la proteína E4 en un 51.42%, contrario a las muestras de saliva, las cuales en su totalidad resultaron negativas para su expresión. Por lo tanto, no pudimos correlacionar la expresión de ambos sitios anatómicos de las pacientes que resultaron positivas a infección por VPH.

20. Referencias bibliográficas.

1. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in medical virology*. 2015 Mar;25 Suppl 1(Suppl Suppl 1):2–23.
2. Bruni L, Albero G, Serrano B, Mena M, Gómez D, Muñoz J, et al. Human Papillomavirus and Related Diseases in the World- Summary report. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). 2019;(June):307.
3. Araldi RP, Sant'Ana TA, Módolo DG, de Melo TC, Spadacci-Morena DD, de Cassia Stocco R, et al. The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2018 Oct;106:1537–56.
4. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012 Nov;30 Suppl 5:F55-70.
5. Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus genes*. 2010 Feb;40(1):1–13.
6. Luna-Aguirre CM, Reyes-Cortés LM, Torres-Grimaldo AA, Karr-de-León SF, Cerda-Flores RM, Melo-Nava B, et al. Prevalence of human papillomavirus types in North and Central regions of Mexico. *Epidemiology and infection*. 2018 Oct;146(13):1724–30.
7. Boletín Epidemiológico Nacional [Internet]. Boletín Epidemiológico Nacional. Available from: <https://www.gob.mx/salud/documentos/boletinepidemiologico-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion-261547>
8. Fajardo-Ramírez OR, Barboza-Cerda MC, Ortiz-López R, Rojas-Martínez A, Garza-Rodríguez ML, Sepúlveda-Flores A, et al. Prevalence and 3-year persistence of human papillomavirus serotypes in asymptomatic patients in Northern Mexico. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2017 Jan;136(1):40–6.
9. Biryukov J, Meyers C. Papillomavirus Infectious Pathways: A Comparison of Systems. *Viruses*. 2015 Aug;7(8):4303–25.
10. Stevenson A, Kavanagh K, Pan J, Stevenson L, Griffin H, Doorbar J, et al. Risk stratification of cervical disease using detection of human papillomavirus (HPV) E4 protein and cellular MCM protein in clinical liquid based cytology samples. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2018 Nov;108:19–25.
11. Syrjänen S. Oral manifestations of human papillomavirus infections. *European journal of oral sciences*. 2018 Oct;126 Suppl(Suppl Suppl 1):49–66.
12. Sichero L, Rollison DE, Amorrortu RP, Tommasino M. Beta Human Papillomavirus and Associated Diseases. *Acta cytologica*. 2019;63(2):100–8.

13. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015 Mar;65(2):87–108.
14. Harden ME, Munger K. Human papillomavirus molecular biology. *Mutation research Reviews in mutation research*. 2017;772:3–12.
15. Alizon S, Murall CL, Bravo IG. Why Human Papillomavirus Acute Infections Matter. *Viruses*. 2017 Oct;9(10).
16. Nasioutziki M, Chatzistamatiou K, Loufopoulos PD, Vavoulidis E, Tsampazis N, Pratilas GC, et al. Cervical, anal and oral HPV detection and HPV type concordance among women referred for colposcopy. *Infectious agents and cancer*. 2020;15:22.
17. Graham S V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clinical science (London, England: 1979)*. 2017 Sep;131(17):2201–21.
18. Stumbar SE, Stevens M, Feld Z. Cervical Cancer and Its Precursors: A Preventative Approach to Screening, Diagnosis, and Management. *Primary care*. 2019 Mar;46(1):117–34.
19. Olusola P, Banerjee HN, Philley J V, Dasgupta S. Human Papilloma Virus-Associated Cervical Cancer and Health Disparities. *Cells*. 2019 Jun;8(6).
20. Prescott EL, Brimacombe CL, Hartley M, Bell I, Graham S, Roberts S. Human papillomavirus type 1 E1^{E4} protein is a potent inhibitor of the serine-arginine (SR) protein kinase SRPK1 and inhibits phosphorylation of host SR proteins and of the viral transcription and replication regulator E2. *Journal of virology*. 2014 Nov;88(21):12599–611.
21. Herfs M, Crum CP. Response to “Two major pathways of recurrent high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix”. Vol. 137, *International journal of cancer*. United States; 2015. p. 2522–3.
22. Wentzensen N, Schiffman M, Palmer T, Arbyn M. Triage of HPV positive women in cervical cancer screening. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2016 Mar;76 Suppl 1(Suppl 1):S49–55.
23. Kim SM. Human papilloma virus in oral cancer. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2016 Dec;42(6):327–36.
24. Valls-Ontañón A, Hernández-Losa J, Somoza Lopez de Haro R, Bellosillo-Paricio B, Ramón Y Cajal S, Bescós-Atín C, et al. Impact of human papilloma virus in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Medicina clinica*. 2019 Mar;152(5):174–80.
25. Taberna M, Mena M, Pavón MA, Alemany L, Gillison ML, Mesía R. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2017 Oct;28(10):2386–98.

26. Clarke MA, Wentzensen N. Strategies for screening and early detection of anal cancers: A narrative and systematic review and meta-analysis of cytology, HPV testing, and other biomarkers. *Cancer cytopathology*. 2018 Jul;126(7):447–60.
27. Caglioti C, Pileggi C, Nobile CGA, Pavia M. Gynecologists and human papillomavirus DNA testing: exploring knowledge, attitudes, and practice in Italy. *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*. 2017 May;26(3):249–56.
28. Cobucci R, Maissonette M, Macêdo E, Santos Filho FC, Rodovalho P, Nóbrega MM, et al. Pap test accuracy and severity of squamous intraepithelial lesion. *Indian journal of cancer*. 2016;53(1):74–6.
29. Uzcátegui Yanyin Betzabe, Tovar María Carolina, Lorenzo Coromoto Jacqueline GMireyaP vaginal: utilidad de la citología y la colposcopia como métodos diagnósticos. *ROGV [Internet]*. 2012 S [citado 2020 N 16]; 72(3): 161 170. D en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_artte. No Title.
30. Tamgadge S, Tamgadge A, Agre B. Writing oral pathology biopsy report: a guide for beginners. *Journal of experimental therapeutics & oncology*. 2018 Nov;12(4):273–9.
31. Taylor JJ, Preshaw PM. Gingival crevicular fluid and saliva. *Periodontology* 2000. 2016 Feb;70(1):7–10.
32. Khurshid Z, Zafar MS, Khan RS, Najeeb S, Slowey PD, Rehman IU. Role of Salivary Biomarkers in Oral Cancer Detection. *Advances in clinical chemistry*. 2018;86:23–70.
33. De Guglielmo Z, Ávila M, Veitía D, Fernandes A, Venegas C, Correnti M. Detección de VPH en boca y cérvix de pacientes con diagnóstico citológico sugestivo de infección genital. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2012 Dec 1;35:445–54.
34. Qureishi A, Ali M, Fraser L, Shah KA, Møller H, Winter S. Saliva testing for human papilloma virus in oropharyngeal squamous cell carcinoma: A diagnostic accuracy study. *Clinical otolaryngology: official journal of ENT-UK; official journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery*. 2018 Feb;43(1):151–7.
35. Martens JE, Arends J, Van der Linden PJQ, De Boer BAG, Helmerhorst TJM. Cytokeratin 17 and p63 are markers of the HPV target cell, the cervical stem cell. *Anticancer research*. 2004;24(2B):771–5.
36. Antonsson A, Cornford M, Perry S, Davis M, Dunne MP, Whiteman DC. Prevalence and risk factors for oral HPV infection in young Australians. *PloS one*. 2014;9(3):e91761.
37. Griffin H, Wu Z, Marnane R, Dewar V, Molijn A, Quint W, et al. E4 antibodies facilitate detection and type-assignment of active HPV infection in cervical disease. *PloS one*. 2012;7(12):e49974.
38. Doorbar J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*. 2013 Oct;445(1–2):80–98.

39. Criscuolo MI, Morelato RA, Belardinelli PA, Mosmann JM, Cuffini C, López de Blanc SA. Oral Human Papillomavirus: a multisite infection. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*. 2020 May;25(3):e425–30.
40. McIntosh PB, Martin SR, Jackson DJ, Khan J, Isaacson ER, Calder L, et al. Structural analysis reveals an amyloid form of the human papillomavirus type 16 E1--E4 protein and provides a molecular basis for its accumulation. *Journal of virology*. 2008 Aug;82(16):8196–203.
41. Browne RH. On the use of a pilot sample for sample size determination. *Statistics in medicine*. 1995 Sep;14(17):1933–40.
42. De Guglielmo Z, Avila M, Veitía D, Fernández A, Venegas C, Correnti de Plata M. Detección de VPH en boca y cérvix de pacientes con diagnóstico citológico sugestivo de infección genital [HPV detection in the mouth and cervix of patients with histological diagnosis suggestive of genital infection]. *An Sist Sanit Navar*. 2012 Sep-Dec;35(3):445-54. Spanish. doi: 10.23938/ASSN.0100. PMID: 23296225.
43. Cab-Sánchez BG, Hernández-Solís SE, Rueda-Gordillo F, Conde-Ferráez L, Gómez-Carballo JG, González-Losa MDR. Epidemiología de la infección oral por VPH en sujetos jóvenes sanos [Epidemiology of oral HPV infection in young healthy individuals]. *Rev Chilena Infectol*. 2017 Dec;34(6):557-562. Spanish. doi: 10.4067/S0716-10182017000600557. PMID: 29488549.
44. Nelson CW, Mirabello L. Human papillomavirus genomics: Understanding carcinogenicity. *Tumour Virus Res*. 2023 Jun;15:200258. doi: 10.1016/j.tvr.2023.200258. Epub 2023 Feb 20. PMID: 36812987; PMCID: PMC10063409.
45. Nelson CW, Mirabello L. Human papillomavirus genomics: Understanding carcinogenicity. *Tumour Virus Res*. 2023 Jun;15:200258. doi: 10.1016/j.tvr.2023.200258. Epub 2023 Feb 20. PMID: 36812987; PMCID: PMC10063409.
46. Plett-Torres T, Cruz-Valdez A, Esquivel-Guadarrama F, Hernández-Nevarez P, Lazcano-Ponce E, Gutiérrez-Xicotencatl L. Frequency of antibodies against E4 and E7 from human papillomavirus type 16 in Mexican soldiers. *Arch Virol*. 2007 Jan;152(1):97-114. doi: 10.1007/s00705-006-0829-5. Epub 2006 Aug 3. PMID: 16896549.
47. Leeman A, Jenkins D, Del Pino M, Ordi J, Torné A, Doorbar J, Meijer CJLM, van Kemenade FJ, Quint WGV. Expression of p16 and HPV E4 on biopsy samples and methylation of FAM19A4 and miR124-2 on cervical cytology samples in the classification of cervical squamous intraepithelial lesions. *Cancer Med*. 2020 Apr;9(7):2454-2461. doi: 10.1002/cam4.2855. Epub 2020 Feb 5. PMID: 32022461; PMCID: PMC7131853.
48. Ma X, Yang M. The correlation between high-risk HPV infection and precancerous lesions and cervical cancer. *Am J Transl Res*. 2021 Sep 15;13(9):10830-10836. PMID: 34650762; PMCID: PMC8507010.
49. Ntuli L, Mtshali A, Mzobe G, Liebenberg LJ, Ngcapu S. Role of Immunity and Vaginal Microbiome in Clearance and Persistence of Human Papillomavirus Infection. *Front Cell Infect*

Microbiol. 2022 Jul 7;12:927131. doi: 10.3389/fcimb.2022.927131. PMID: 35873158; PMCID: PMC9301195.

50. López-Revilla R, Martínez-Contreras LA, Sánchez-Garza M. Prevalence of high-risk human papillomavirus types in Mexican women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Infect Agent Cancer*. 2008 Feb 28;3:3. doi: 10.1186/1750-9378-3-3. PMID: 18307798; PMCID: PMC2294112.
51. 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 Mar 30;11:16. doi: 10.1186/s13027-016-0063-z. PMID: 27030798; PMCID: PMC4812629.
52. Serrano B, Alemany L, Ruiz PA, Tous S, Lima MA, Bruni L, Jain A, Clifford GM, Qiao YL, Weiss T, Bosch FX, de Sanjosé S. Potential impact of a 9-valent HPV vaccine in HPV-related cervical disease in 4 emerging countries (Brazil, Mexico, India and China). *Cancer Epidemiol*. 2014 Dec;38(6):748-56. doi: 10.1016/j.canep.2014.09.003. Epub 2014 Oct 8. PMID: 25305098.

21. Anexos

21.1 Consentimiento Informado



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN EL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN TITULADO:

“Correlación de los niveles de expresión de la proteína E4 en saliva y cérvix en pacientes con infección por Virus Papiloma Humano genotipos de alto riesgo. Estudio Piloto Multicéntrico.”

Lugar y Fecha: San Luis Potosí, S.L.P. A ____ de ____ de 2022

Número de registro: SLP/ 06 2021

Estimado C._____, el Hospital del Niño y la Mujer “Dr. Alberto López Hermoso” , la Comisión de Bioética de San Luis Potosí, secretaria de servicios de salud (SSA) y la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), a través de la Maestría en Ciencias en Investigación Clínica, están realizando un protocolo de investigación titulado *“Correlación de los niveles expresados de la proteína E4 en saliva y cérvix en pacientes con infección por VPH genotipos de altos riesgo. Estudio Piloto Multicéntrico.”* Y para ello queremos pedirle su participación en el proyecto de investigación que incluirá mujeres adultas a partir de los 18 años, las cuales presenten lesión en el cuello de la matriz (cérvix) por VPH o (el diagnóstico de VPH en el cuello de la matriz).

En este estudio se incluirán 30 pacientes con infección por VPH durante el año _____ a partir de su aprobación y se realizará en el servicio de Ginecología del Hospital del

Niño y la Mujer “Dr. Alberto López Hermosa.” Y en la consulta privada del Dr. José Zermeño Nava, ubicado en: De Las Ciencias 110b, Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P.

Este protocolo tiene como objetivo determinar la presencia de la proteína E4, la cual se encuentra presente en el del Virus Papiloma Humano, específicamente el tipo 16, el cual está relacionado a cáncer. Y así poder relacionar los niveles tanto del cuello de la matriz (cérvix) como en saliva, de la paciente.

En este documento se le proporcionará información detallada acerca del procedimiento, posibles riesgos y/o beneficios. Es necesario que entienda en que consiste su participación y que la información sea clara, para firmar este documento. Siéntase con la libertad de preguntar si tiene dudas acerca del proceso, para ayudarle a resolverlas.

Información para el paciente

Su participación contribuirá al estudio de los niveles de la proteína del virus, presentes en saliva y el cuello de la matriz para así relacionarlos, lo cual podría permitir en un estudio futuro establecer el uso de esta proteína para detectar la infección en etapas más tempranas.

Procedimientos a los que se someterá la paciente

Si usted acepta participar en este estudio, el procedimiento será el siguiente:

1. Se tomarán datos generales de su historia clínica, como nombre completo, edad y diagnóstico.
2. Se realizará un interrogatorio para conocer posibles factores de riesgo.
3. Se tomará una muestra del cuello de la matriz, la cual consiste en tomar una citología (con ayuda de un cepillo desechable se obtendrán células que posteriormente se analizarán en el microscopio) del cuello del cervix (como un Papanicolaou)
4. Posteriormente se realizará una muestra de la boca, recolectando saliva en un frasco estéril. Se analizarán las muestras, mediante una técnica de biología molecular

conocida como *PCR* (reacción en cadena de la polimerasa) para conocer el tipo de Virus Papiloma Humano presente e identificar la proteína.

5. Se analizará también con la misma técnica de biología molecular para determinar la presencia de la proteína E4.

Su participación en este estudio de investigación es completamente voluntaria y si usted acepta participar, le pediremos que lea cuidadosamente el presente documento de consentimiento informado y que haga todas las preguntas necesarias al médico investigador responsable, (C.D.P.B. CELINA GARCÍA RAMOS), para que puedan resolver sus dudas.

Cuando ya no tenga alguna duda con respecto a lo que se hará en este estudio le pediremos que firme su aceptación de participar al final de este documento, y le pediremos nos proporcione información general.

Posibles beneficios al participar en el estudio

Si usted acepta participar en el estudio, los beneficios no serán inmediatos, pero contribuirá para un estudio futuro, poder detectar la infección por VPH basado en la presencia de la proteína E4.

En el caso de las pacientes de la consulta del Dr. Zermeño, se realizará un seguimiento a los 6 meses y al año.

Riesgos y molestias

Los riesgos en este estudio son mínimos. En el momento de la toma de muestra en cérvix podrá sentir una ligera molestia momentánea. Y respecto a la muestra de la boca, podrá sentir un ligero reflejo nauseoso y/o molestia momentánea.

Sin embargo, en el remoto caso de que sintiera alguna otra molestia generada por la investigación, es necesario notificarla inmediatamente para proporcionarle la atención necesaria, la cual no generara algún costo para usted.

Cabe mencionar que usted no recibirá ningún pago por participar en el estudio y se le entregará una copia del presente documento de consentimiento informado.

Confidencialidad

La información personal y medica obtenida de usted en este estudio es de carácter confidencial y será utilizada únicamente por el equipo de investigación de este proyecto para analizar y complementar los resultados obtenidos y no estará disponible para ningún otro propósito. Esta información se conjuntará con la de otros participantes para realizar el presente estudio.

Si usted así lo decide los investigadores responsables de este estudio le podrán informar a su médico tratante que usted ha aceptado participar en este estudio, para que la información que se obtenga sea incluida en su expediente clínico.

Los resultados de este estudio se presentarán de forma anónima, pero podrán ser publicados con fines científicos en revistas relacionadas con el área de la salud. También, podrán ser presentados en reuniones científicas (congresos), para presentar información relevante con su patología.

De acuerdo con la Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados y a la Ley de Protección de Datos Personales del estado de San Luis Potosí, sus datos personales no podrán tratarse, transferirse o utilizarse para fines no descritos expresamente en este documento.

Participación o retiro

Su participación es completamente voluntaria está en la libertad de negarse a participar en este estudio de investigación; si usted así lo decide y sin necesidad de dar ninguna

explicación, podrá revocar o anular el consentimiento que ahora firma. Su decisión de participar o no, no afectara de ninguna forma el trato médico que reciba en la institución para su enfermedad. Si decide terminar su participación en este estudio, deberá comunicar su decisión.

Información sobre resultados

Contacto

Si usted tiene alguna pregunta, comentario o aclaraciones acerca de su participación en este estudio, puede comunicarse con el investigador responsable del estudio:

C.D.P.B. Celina García Ramos

Alumna de la Maestría en Ciencias en Investigación Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Av. Dr. Manuel Nava No. 2, Zona Universitaria San Luis Potosí, S.L.P., México, C.P. 78290

e-mail: A324743@alumnos.uaslp.mx

D. en C. Úrsula Fabiola Medina Moreno

Maestría en Ciencias en Investigación clínica. Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

e-mail: ursula.medina@uaslp.mx

Número telefónico: 444 826 2342 EXT.6688

Cuando ya no tenga dudas de su participación, y si acepta colaborar con nosotros, le pediré que por favor marque una X en el recuadro de abajo.

- ☐ Si, quiero participar
- ☐ No, quiero participar

Si decide participar, favor de marcar con una X en el cuadro, si:

- ☐ He leído el contenido de esta carta de consentimiento informado
- ☐ Se me ha explicado de forma clara este documento y las implicaciones del estudio. Se me ha dado una copia de este documento.

Revocación del Consentimiento Informado

San Luis Potosí, S.L.P. A _____

Yo, _____, deseo retirar mi participación del presente protocolo titulado “Correlación de los niveles de expresión de la proteína E4 en saliva y cérvix en pacientes con infección por Virus Papiloma Humano genotipos de alto riesgo. ”

Nombre completo y firma del paciente

Nombre completo y firma del testigo

C.D.E.P.B.Celina García Ramos
Investigador Principal

D.en C. Úrsula Fabiola Medina Moreno
Investigador del protocolo

21.2 Aviso de privacidad

En base a la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares Capítulo II de los Principios de Protección de Datos Personales artículo 15 y 16 ley publicada en el diario oficial de la federación el 5 de julio de 2010.

Por favor lea cuidadosamente y de forma responsable, la protección de sus datos personales.

Para efecto de recibir todo tipo de notificaciones con respecto a los derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición o revocación contenidos VII, VIII y IX del presente aviso de privacidad, se le proporciona los siguientes datos de contacto:

Título del estudio: “Correlación de los niveles de expresión de la proteína E4 en saliva y cérvix en pacientes con Virus Papiloma Humano genotipos de alto riesgo. Estudio Piloto multicéntrico.”

Investigadores responsables: C.D.P.B. Celina García Ramos y D. En C. Úrsula Fabiola Medina Moreno

Teléfono: 444 826 2342 EXT. 6688

E-mail: A324743@alumnos.uaslp.mx y ursula.medina@uaslp.mx

Información que se le solicitará:

Su información personal ~~se~~^á utilizada con la finalidad de determinar la presencia de la proteína E4, la cual se encuentra en la estructura proteica del Virus Papiloma Humano, específicamente en los tipos de alto riesgo, el cual está estrechamente relacionados a neoplasias malignas. Y así poder asociar los niveles tanto del cuello de la matriz como en saliva, de la paciente.

Es importante que usted sepa que todo el equipo de investigación que colabora en este estudio se compromete a que todos los datos proporcionados por usted sean tratados bajo medidas de seguridad y garantizando siempre su confidencialidad.

Usted tiene derecho de acceder, rectificar y cancelar sus datos personales, así como de oponerse al manejo de estos o anular el consentimiento que nos haya otorgado para tal fin.

Además del investigador principal, le aclaramos que la información de sus datos personales puede ser compartida y manejada por personas distintas a esta institución, solamente con fines del proyecto de investigación, de ser necesario puede llegar a ser compartida con los Investigadores de este equipo de estudio con la finalidad de difundir algunos de los datos recabados durante la investigación en medios de divulgación científica nacionales o extranjeros, manteniendo siempre anónimos sus datos personales.

Declaración de conformidad:

Si usted no manifiesta oposición para que sus datos personales se compartan con las instancias mencionadas, se entenderá que ha otorgado su consentimiento para ello.

21.3 Hoja de Recolección de datos.

Ficha Identificación

Número de Expediente _____

Nombre de la paciente _____

Edad _____

Fecha de nacimiento _____

Antecedentes Gineco-obstétricos

- Ultimo papanicolaou (citología cervical) : _____
- Edad en que inicio su vida sexual: _____
- Número de parejas sexuales: _____

Toxicomanías

- Ingesta de bebidas alcohólicas de manera social: si _____ no _____
- Tabaco: (Consumo de cigarros al día)
Menos de 10: _____
10-20: _____
21-40: _____
Mas de 41: _____

Diagnóstico (expediente clínico y llenado por el médico)

- Diagnóstico clínico actual: _____
- Presencia de lesiones por VPH: si _____ no _____

Tamizaje y genotipificación del VPH (posterior al análisis de las muestras)

PCR MUESTRA CERVICAL _____

PCR MUESTRA DE SALIVA _____

21.4 Cronograma de actividades

	Marzo-Julio 2020	Nov-Dic 2020	Marzo 2021-Octubre 2021	Enero-Marzo 2022	Marzo 2022-Diciembre 2023	Octubre 2023-Enero 2024	Enero 2024
Elaboración del protocolo							
Presentación ante el comité académico de la MCIC							
Presentación ante el comité de ética del instituto							
Recolección de muestras							
Análisis de las muestras en el Laboratorio de Microbiología							
Interpretación de los datos obtenidos y análisis estadístico							
Presentación de los resultados							

21.12 Manual Operativo

“Correlación de los niveles de expresión de la proteína E4 en saliva y cérvix en pacientes con infección por Virus Papiloma Humano (VPH) genotipos de alto riesgo. Estudio Piloto Multicéntrico.”

Equipos que se utilizarán:

- Termociclador Labnet International TC9610 MultiGene OptiMax Thermal Cycler, 115V
- Fotodocumentador Axygen Gel Documentation System
- Termociclador tiempo real modelo CFX96 marca Bio rad
- Nanodrop One de Thermofisher Scientific, espectrofotometro

Toma de muestra de cérvix:

Se colocará a la paciente en posición de litotomía y se colocará el espejo vaginal.

La toma del canal cervical o zona de transformación será con cytobrush

Se colocará el cytobrush en un frasco estéril con Preservcyt, previamente etiquetado.

*La muestra de cérvix será tomada por la Dra. Olimpia Porras en el Hospital del Niño y la Mujer, y por el *Dr. José Zermeño* en el consultorio privado.

Toma de muestra de saliva:

- Pedir a la paciente realizar movimientos de la lengua para estimular la producción de saliva

- Recolectar la saliva que se va acumulando en un frasco estéril hasta conseguir 2mL.

* La muestra de saliva será tomada por la tesista, *Celina García Ramos*.

Manejo de la muestra

Ambas muestras serán transportadas en hieleras con geles congelantes desde el Hospital y/o del consultorio privado hasta el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UASLP, donde se hará el procesado.

Se harán alícuotas de 200 ul y una vez etiquetadas se almacenarán a -80C.

Procesado de las muestras:

Método de extracción de ADN

- A los 200 ul de la alícuota, agregar:
 - 500 ul de Buffer de lisis
 - 50 ul de SDS al 10%
 - 20 ul de proteinasa K
- Vortex 30 segundos
- Incubar a 55 C /90'800rpm
- Añadir 199.2 ml de NaCl y mezclar por inversión manual
- Centrifugar a 13200 rpm por 15 minutos
- Recolectar el sobrenadante en tubo eppendorf de 1.5 ml estéril y etiquetado
- Añadir 760U ul de Isopropanol concentrado, frio (almacenado a -20 C). Mezclar por inversión manual
- Reposar a -20 C toda la noche
- Centrifugar a 1320 rpm/10 min. Desechar el sobrenadante por decantación y secar la pastilla (DNA), invertido el tubo sobre papel absorbente por 5 minutos.
- Lavado. Agregar 500ul de etanol al 70% en agua desionizada estéril. Mezclar por inversión manual.
- Centrifugar a 10000 rpm/10 min. Desechar el sobrenadante por decantación y secar la pastilla (DNA), invertido el tubo sobre papel absorbente estéril hasta sequedad total. (15 a 20 minutos)
- Re suspender el DNA en 50 ul de TE. Almacenar en refrigeración (2 a 8 C) para realizar PCR.

Calidad y concentración de ADN

- Se realizará mediante el método de absorbancia, con el Nanodrop One de ThermoFisher Scientific, Espectrofotometro
- Marcando la absorbancia en una relación 260/280 y siendo el rango ideal entre 1.7 y 2.

Tamizaje para VPH

- Se realizó mediante PCR tiempo real, utilizando el kit Omega Plex de Genes2life
- Utilizando el termociclador tiempo real modelo CFX96 marca Biorad
- Realizar la preparación de reacción de PCR

Componente	Volumen /rxn
Buffer omega 5x	4UL
Agua libre de nucleasas	6UL
Primer Mix	4UL
Enzima Omegataq	1UI
Templado	5UL
Volumen total	20UI

- Preparando una mezcla de reacción utilizando omega VPH1 primer mix, y otra independiente con omega VPH2 primer mix.
- Mezclar los componentes de la reacción de PCR . Homogenizar suavemente con una micropipeta y centrifugar 5 segundos para colectar la mezcla preparada en el fondo del tubo.
- Dispensar 15UL EN CADA UNO DE LOS POZOS O TUBOS A UTILIZAR.
- Agregar 5 UL de agua libre de nucleasas a la reacción destinada al control negativo
- Hay que asegurar que cada muestra tenga 1 reacción correspondiente a omega VPH1 primer mix y otra de VPH2 primer mix
- Preparar los controles positivos
- Se programa el termociclador:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Desnaturalización inicial	2 minutos	95 C
45	Desnaturalización	10 segundos	95 C
	Alineamiento /Extensión (lectura de datos)	35 segundos	58 C

Genotipificación

- Se realizará mediante PCR tiempo real, utilizando el Kit OmegaPlex de Genes2Life
- En el **Termociclador tiempo real modelo CFX96 marca Bio rad**

Expresión del ARN mensajero de E4

- Se realizará mediante PCR tiempo real.
- **Termociclador tiempo real modelo CFX96 marca Bio rad**
- Realizando la extracción de ARN, utilizando el Kit Quick-DNA/RNA Pathogen miniprep
- Transcripción reversa para obtener cADN
- Análisis del transcrito por el método de cuantificación relativa

Extracción de ARN con Kit Quick-DNA/RNA Pathogen miniprep

- Preparar la solución de buffer agregando betamercaptoetanol al 0.5%
- Agregar 250 UI – 500 UL betamercaptoetanol por 50 ml o 100 ml de DNA/RNA pahogen buffer, respectivamente.
- Agregar 24 ml de etanol al 100% a 6ml de concentrado buffer de enjuague
- Agregar 260 UL de proteinasa K
- Agitar en vórtex
- Purificación del DNA/RNA
- Agregar 800 UL de buffer pathogen a cada 400 UL de muestra
- Mezclar
- Transferir la mezcla a columna de Zymo-Spin en un tubo recolector y centrifugar
- Descartar el sobrenadante
- Agregar 500 UL de buffer a la columna y centrifugar, tirar el sobrenadante (repetir este paso)
- Agregar 500 UL de etanol (95-100%) a la columna y centrifugar por 1 minuto para asegurar la remoción de cualquier residuo de etanol.

- Descartar el tubo recolector y cuidadosamente transferir la columna a un nuevo tubo.
- Para elución de DNA/RNA, agregar 50 UL agua libre de nucleasas a la columna y centrifugar.

21.13 Kit Genotipificación VPH



GENES2LIFE SA DE CV
RFC: GEN130729FB9

EUQUERIO GUERRERO # 278,
COL. TABACHINES, CP. 36615,
IRAPUATO, GUANAJUATO, MÉXICO
01 (462)63.52.718

COTIZACIÓN

382

29/09/2021

Por este conducto me permito presentar a su amable consideración la siguiente cotización:

ATENCIÓN:

DRA. SOFIA BERNAL SILVA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

PARTIDA	CANTIDAD	DESCRIPCIÓN DEL ARTÍCULO	NO. CATÁLOGO	PRECIO UNITARIO	TOTAL
1	1	Qplex VPH. KIT PARA LA DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO. ES UN SISTEMA DE DOS REACCIONES POR PRUEBA RXN 1 CONTROL ENDÓGENO (HEX) VPH 16 (Q670) VPH 18. (CFR610) VPH 45,51,73,82,31,35 (FAM) RXN2 CONTROL ENDÓGENO (HEX) VPH 54 (Q670) VPH 56. (CFR610) VPH 33,52,58,39,59,68 (FAM), EL KIT EN MENCIÓN CUENTA CON LOS CONTROLES Y REACTIVOS NECESARIOS PARA 100 PRUEBAS. MARCA: GENES2LIFE RUJO	G2LOVPH-01	\$ 20,800.00	\$ 20,800.00

TIEMPO DE ENTREGA

SUB-TOTAL \$ 20,800.00
IVA \$ 3,328.00
SUBTOTAL \$ 24,128.00

ATENTAMENTE

Dr. OCTAVIO GARCÍA
Director General
octavio@tdoligo.com

En caso de vernos favorecidos con su pedido, favor de confirmar la aprobación de esta cotización al correo: genes2life@grupotxyz

DATOS BANCARIOS
BANCO DEL BAJO
17265976
03021090009222655
GUANAJUATO
11001

DATOS FISCALES PARA EL PAGO DE SU PEDIDO

Razón social: GENES2LIFE SA DE CV
RFC: GEN130729FB9
Dirección fiscal: EUQUERIO GUERRERO # 278, COL. TABACHINES, CP. 36615.

21.14 TaqGold

Protocol Pub. No. MAN0009863 Rev. A.0

AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase

	Package Contents	Catalog Number N808-0240 AmpliTaq Gold® with Buffer I 250 Units N808-0241 AmpliTaq Gold® with Buffer II 250 Units 4311806 AmpliTaq Gold® with Gold Buffer 250 Units Kit Contents
	Storage Conditions	Store all contents at -20°C.
	Required Materials	- Template: cDNA, gDNA, λDNA 10 mM dNTP mix (Cat. no. 18427-088) - Forward and reverse gene-specific primers - Autoclaved, distilled water - E-Gel® General Purpose Gels, 1.2% (Cat. no. G5018-01) - TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder (Cat. no. 10488-085) 0.2 or 0.5-mL nuclease-free microcentrifuge tubes
	Timing	Varies depending on amplicon length
	Selection Guide	PCR Enzymes and Master Mixes Go online to view related products.
	Product Description	- AmpliTaQ Gold® is derived from recombinant, thermostable, 94 kDa DNA polymerase, encoded by a modified form of the <i>Thermus aquaticus</i> DNA polymerase gene. It is available with 3 different buffers, which provide preferred pH and ionic strength for PCR amplification reactions. - With AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, Hot Start and Time Release PCR can be introduced into existing amplification systems by modifying cycling parameters or reaction conditions for increased specificity, sensitivity, and yield. - AmpliTaQ Gold® is provided in an inactive state and can be completely or partially activated in a pre-PCR heat step, allowing flexibility and assembly of reactions at room temperature.
	Important Guidelines	- Take precautions to avoid cross-contamination by using aerosol-resistant barrier tips and analyzing PCR products in a separate area from PCR assembly. - If the samples contain EDTA or other chelators, raise the MgCl₂ concentration in the reaction mix proportionately. - If proteases are present in the sample DNA (e.g. impure genomic DNA), inactivate the proteases by heating samples to 95°C for 5 minutes before adding AmpliTaq Gold®.
	Online Resources	Visit our product page for additional information and protocols. For support, visit www.lifetechnologies.com/support . 

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Enzyme Characteristics

Hot-start:	Chemical
Length:	Up to 5 kb
Fidelity vs. Taq:	1X
Format:	Separate components

PCR Reaction Setup

Use the measurements below to prepare your PCR experiment, or enter your own parameters in the column provided.

Component	25-µL rxn	50-µL rxn	Custom	Final Conc.
Autoclaved, distilled water	to 25 µL	to 50 µL	to µL	–
10X PCR Buffer I, II, or Gold Buffer	2.5 µL	5.0 µL	µL	1X
10 mM dNTP Mix*	0.5–5.0 µL	1.0 µL	µL	0.2 mM
25 mM MgCl ₂ **	1.5 µL	3.0 µL	µL	1.5 mM
10 µM forward primer	0.5 µL	1.0 µL	µL	0.2 µM
10 µM reverse primer	0.5 µL	1.0 µL	µL	0.2 µM
Template DNA	varies	varies		< 1 µg/rxn
AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase (5 U/µL)	0.125 µL	0.25 µL	µL	1.25 U/50-µL rxn

* Substituting dUTP for dTTP to control PCR product carryover may require higher concentrations of dUTP (typically twice that of any other dNTP) for optimal amplification.

** Use MgCl₂ with Buffer II or Gold only. Buffer I already contains Mg.

PCR Protocol

 See page 2 to view a procedure for preparing and running your PCR experiment.

Optimization Strategies

 Refer to the pop-up for guidelines to optimize your PCR reactions.

Limited Warranty, Disclaimer, and Licensing Information

life
technologies™

Print Options

21.15 Inserto Kit Omega Plex



Indicaciones de uso

Detección de los serotipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 54, 56, 58, 59, 68, 73, 82.

Uso exclusivo en investigación científica

Serotipos detectados por Ω -Plex VPH

Los serotipos que son detectados dentro del kit son:

Alfapapilomavirus 5 (HPV 51, 82)

Alfapapilomavirus 6 (HPV 56)

Alfapapilomavirus 7 (HPV 18, 39, 45, 59, 68),

Alfapapilomavirus 9 (HPV 16, 31, 33, 35, 52, 58),

Alfapapilomavirus 11 (HPV 73)

Alfapapilomavirus 13 (HPV 54)

Estos serotipos se encuentran distribuidos en dos reacciones que se pueden correr de manera simultánea.

Todos los serotipos mencionados presentan el riesgo de establecer infecciones crónicas. En ello recae la importancia de clasificar el serotipo de VPH presente, así como monitorear el progreso de la infección.

Con tal objetivo en mente se diseñó Ω -Plex VPH, un kit que permite la detección de 16 serotipos del Virus del Papiloma Humano, dividido en dos reacciones cuádruplex, con los reactivos necesarios para procesar 100 pruebas. Además de ello, permite la identificación de algunos serotipos del virus, clasificándolos en:

En la primera reacción multiplex se detectan los serotipos: 16 (Quasar 670), 56 (Cal Fluor Red 610) y 31, 35, 45, 51, 73, 82 (FAM), además cuenta con un control endógeno de DNA marcado en HEX. En la segunda reacción multiplex se detectan los serotipos: 54 (Quasar 670), 18 (Cal Fluor Red 610) y 33, 39, 52, 58, 59, 68 (FAM), de igual manera cuenta con un control endógeno de DNA marcado en HEX.

La muestra a evaluar será ADN extraído que puede ser obtenido a partir de una muestra de tejido mediante el uso de un kit de extracción y purificación de ácidos nucleicos. Esta muestra puede ser tomada por un ginecólogo usando un espéculo, y un cepillo o hisopo con el cuál se tomarán células del cérvix.

2. PROTOCOLO

- 2.1. Descongelar los Primer Mix (Ω -VPH1 Primer Mix y Ω -VPH2 Primer Mix), así como el Buffer 5X, la Enzima, y el Agua libre de nucleasas.
- 2.2. Mantener los reactivos en una gradilla fría (2 - 8 °C) durante el tiempo que dure la preparación de la reacción de PCR.
- 2.3. Realizar los cálculos correspondientes al número de reacciones necesarias. El número de reacciones a preparar será igual al número de muestras a analizar, más dos reacciones que serán utilizadas para el control positivo, negativo y las reacciones de exceso. Por cada 10 reacciones que se preparen, se recomienda agregar una reacción de exceso para compensar la pérdida de volumen por adsorción en superficies. Tome como referencia los valores mostrados en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Preparación de reacción de PCR

Componente	Volumen/rxn
Buffer Omega 5X	4 μ L
Agua libre de nucleasas	6 μ L
Primer Mix	4 μ L
Enzima OmegaTaq	1 μ L
Templado (No agregar)	5 μ L
Volumen total	20 μ L

Preparar una mezcla de reacción utilizando Ω -VPH1 Primer Mix, y otra independiente con Ω -VPH2 Primer Mix. El número de reacciones a preparar es el mismo para ambos Primer Mix.

- 2.4. Mezclar los componentes de la reacción de PCR, en el siguiente orden: Buffer Omega 5X, Agua libre de nucleasas, Primer Mix (el correspondiente a la reacción preparada) y finalmente Enzima. Homogenizar suavemente con una micropipeta y centrifugue 5 segundos para coleccionar la mezcla preparada en el fondo del tubo. Dispensar 15 μ L en cada uno de los pozos o tubos a utilizar. Antes de dejar el área de preparación de reacciones, agregar 5 μ L de Agua libre de nucleasas a la reacción destinada al control negativo.
- 2.5. Llevar las reacciones al área destinada para la adición de muestras y agregue 5 μ L de muestra a cada reacción. Asegurar de que cada



muestra tenga 1 reacción correspondiente a Ω -VPH1 Primer Mix y otra de Ω -VPH2 Primer Mix, ya que de lo contrario no podrá analizar los resultados del ensayo.

- 2.6. Finalmente, para preparar los controles positivos, agregar 5 μ L del C- Ω -VPH-1 control a una reacción preparada con Ω -VPH1 Primer Mix. y 5 μ L de C- Ω -VPH-2 control a una reacción preparada con Ω -VPH2 Primer Mix.
- 2.7. Una vez preparadas las reacciones, programar en el termociclador el protocolo indicado en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Protocolo de termociclado para el kit Ω -Plex VPH

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Desnaturalización inicial	2 minutos	95°C
45	Desnaturalización	10 segundos	95°C
	Alineamiento/extensión (lectura de datos)	35 segundos	58°C

La toma de datos debe ser llevada a cabo durante el paso de extensión (66°C). Se deben usar los canales correspondientes a FAM, HEX, Cal Fluor Red 610, y Quasar 670. El protocolo es el mismo para ambas reacciones.

July 2020

QIAamp[®] Viral RNA Mini Handbook

For purification of viral RNA
from plasma, serum, cell-free
body fluids, and culture
supernatants

— Sample to Insight —

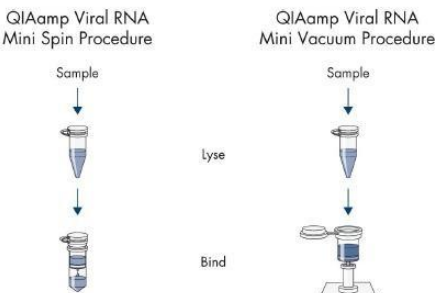


Kit Contents

QIAamp Viral RNA Mini Kit	(50)	(250)
Catalog no.	52904	52906
No. of preps	50	250
QIAamp Mini Spin Columns	50	250
Collection Tubes (2 ml)	150	750
Buffer AVL*	31 ml	155 ml
Buffer AW1* (concentrate)	19 ml	98 ml
Buffer AW2† (concentrate)	13 ml	66 ml
Buffer AVE†	3 x 2 ml	20 ml
Carrier RNA (poly A)	310 µg	1550 µg

* Contains chaotropic salt, which is an irritant. Not compatible with disinfecting reagents that contain bleach. See page 6 for safety information.

† Contains sodium azide as a preservative.



Preparation of reagents

Add Buffer AVE to the tube containing lyophilized carrier RNA to obtain a solution of 1 µg/µl (i.e., add 310 µl Buffer AVE to 310 µg lyophilized carrier RNA, or 1550 µl Buffer AVE to 1550 µg lyophilized carrier RNA; check the tube label for content). Dissolve the carrier RNA thoroughly, divide it into conveniently sized aliquots, and store it at -30 to -15°C. Do not freeze-thaw the aliquots of carrier RNA more than 3 times.

Addition of dissolved carrier RNA to Buffer AVL*

Check Buffer AVL for precipitate, and if necessary incubate at 80°C until the precipitate is dissolved. Calculate the volume of Buffer AVL-carrier RNA mix needed per batch of samples by selecting the number of samples to be simultaneously processed from Table 1 (next page). For larger numbers of samples, volumes can be calculated using the following sample calculation:

$$n \times 0.56 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} \times 10 \text{ µl/ml} = z \text{ µl}$$

Where: **n** = number of samples to be processed simultaneously

y = calculated volume of Buffer AVL

z = volume of carrier RNA-Buffer AVE to add to Buffer AVL

Gently mix by inverting the tube 10 times. To avoid foaming, do not vortex.

* Contains chaotropic salt. Take appropriate laboratory safety measures and wear gloves when handling. Not compatible with disinfecting agents that contain bleach. See page 5 for safety information.

21.17 Inserto Kit extracción ARN saliva



Quick-DNA/RNA™ Pathogen Miniprep

DNA & RNA from any vector-borne pathogen

Highlights

- Spin-column purification of pathogen (virus, bacteria, protozoa) DNA and RNA from a wide variety of vectors (mosquitoes, fleas, ticks, etc.) and tissue types (mammals, birds, etc.).
- High-quality DNA/RNA is ready for Next-Gen sequencing, RT/qPCR, hybridization, etc.
- DNA/RNA Shield™ is included for sample collection, inactivation, storage and preservation.

Catalog Numbers:
R1042, R1043



Scan with your smart-phone camera to
view the online protocol/video.

Protocol

The protocol consists of: (I) Buffer Preparation, (II) Sample Preparation and (III) DNA/RNA Purification.

(I) Buffer Preparation

- ✓ Add beta-mercaptoethanol to 0.5% (v/v) i.e., add 250 µl or 500 µl β-Me per 50 ml or 100 ml **Pathogen DNA/RNA Buffer**, respectively.
- ✓ Add 24 ml of 100% ethanol (26 ml of 95% ethanol) to the 6 ml **Pathogen DNA/RNA Wash Buffer** concentrate (R1042) or 192 ml of 100% ethanol (204 ml of 95% ethanol) to the 48 ml **Pathogen DNA/RNA Wash Buffer** concentrate (R1043).
- ✓ Add 260 µl or 1,040 µl **Proteinase K Storage Buffer** to reconstitute per 5 mg or 20 mg lyophilized **Proteinase K**, respectively. Mix by vortexing. Use immediately or store frozen aliquots.

(II) Sample Preparation

- ✓ Perform all steps at room temperature (20-30°C).
- ✓ Up to 400 µl sample can be processed per prep.

Tissue¹ (tough-to-lyse insects and tissue)

Up to 10 mg tissue (see table below) can be homogenized in ≥ 400 µl **DNA/RNA Shield**^{™2} with a mortar/pestle, dounce, syringe, tissue grinder, or bead beating with a high-speed homogenizer. To remove particulate debris, centrifuge the homogenate and transfer the cleared supernatant into a nuclease-free tube. Proceed with purification, page 7.

Recommended: To a ZR BashingBead[™] Lysis Tube (#S6014; sold separately), add the appropriate amount of sample to **DNA/RNA Shield**[™], then mechanically homogenize³.

Input	Mosquitoes	Ticks	Fleas	Deer fly	Tissue
per prep (pool)	50	1 engorged 5 flat adults 20 nymphs	10	1 adult	animal, plant (≤ 10 mg)
High-speed ³	3-5 minutes				30-60 seconds
Low-speed ³	≥ 10 minutes (optimization may be required)				

Swabs (UTM[®]/VTM[®], PBS, saline, etc.)

Proceed directly with purification, page 7.

Optional: To inactivate, store and preserve samples at room temperature prior to processing, add an equal volume of **DNA/RNA Shield**[™] (2X concentrate) (#R1200; sold separately) to a volume of liquid sample (1:1) and mix well.

Samples in DNA/RNA Shield^{™2} **collection devices** (swabs, saliva, etc.)

Proceed directly with purification, page 7.

Optional - **Proteinase K treatment** (protein-rich samples e.g., tissue and biological liquids, can be treated):

Add 1% **Proteinase K** (v/v) at 20 mg/ml directly to a liquid sample. Mix well and incubate at room temperature for 15 minutes. Note: Up to 5% Proteinase K can be added (e.g., tissue). For example: Add 4-20 µl Proteinase K to each 400 µl sample.

¹ To remove particulate debris or cryoprecipitates (if any), centrifuge and transfer up to 400 µl of the cleared supernatant into a nuclease-free plate/tube (not provided).

² At this point, samples in **DNA/RNA Shield**[™] can be stored at ambient temperature (4-25°C) for a month, 3 days at 37°C, or long-term (> 1 year) -20°C or below.

³ Perform bead beating at maximum speed with a high-speed homogenizer (e.g., MP Bio FastPrep-24, Bertin Precellys, etc.) or with a low-speed homogenizer (e.g., Disruptor Genie, etc.).

(III) DNA/RNA Purification

- ✓ Perform all steps at room temperature (20-30°C).
 - ✓ The sample input can be scaled up or down, proportionally.
1. Add 800 µl **Pathogen DNA/RNA Buffer**¹ to each 400 µl sample² (2:1) and mix well².
 2. Transfer the mixture into a **Zymo-Spin™ IICR Column**³ in a **Collection Tube** and centrifuge. Discard the flow-through.

Optional: At this point, DNase I treatment can be performed (see Appendices, page 8).
 3. Add 500 µl **Pathogen DNA/RNA Wash Buffer** to the column and centrifuge. Discard the flow-through and repeat this step.
 4. Add 500 µl ethanol (95-100%) to the column and centrifuge for 1 minute to ensure removal of any residual ethanol. Discard the collection tube and carefully transfer the column into a new nuclease-free tube (not provided).
 5. To elute DNA/RNA, add 50 µl **ZymoBIOMICS™ DNase/RNase-Free Water** directly to the matrix of the column and centrifuge.

Alternatively, for highly concentrated DNA/RNA use ≥ 25 µl elution volume.

The eluted DNA/RNA⁴ can be used immediately or stored frozen.

21.18 Tabla revisión de artículos

Título, autores y año de publicación	Diseño y tamaño muestral	Objetivo y criterios de inclusión	Población	Resultados
Frequency of antibodies against E4 and E7 from human papilloma virus type 16 in Mexican Soldiers. (2007) Plett-Torres T, Cruz-Valdez A, Esquivel-Guadarrama F, Hernández-Nevarez P, Lazcano-Ponce E, Gutiérrez-Xicotencatl L. Frequency of antibodies against E4 and E7 from human papillomavirus type 16 in Mexican soldiers. Arch Virol. 2007 Jan;152(1):97-114.	-Estudio transversal. -288 soldados mexicanos.	Determinar la prevalencia de VPH y los anticuerpos presentes contra E4 y E7. Hombres en buen estado físico y mental.	288 Soldados mexicanos	31% (88) VPH 19% tipos de bajo riesgo 11% tipo 16 13% positivos para anticuerpos E4 6% positivos para E7 47% infección en múltiples sitios.
Detection of antibodies to the E4 or E7 proteins of HPV in human sera by Western blot analysis: type-specific reaction of anti-HPV16 antibodies. Ingrid Jochmus, Jan N. Bouwes	-Estudio transversal -346 muestras de Suero humano 120 de trasplantes renales 21 con verrugas genitales o	Caracterizar la especificidad de la reacción de anticuerpos para las proteínas E4 y E7 de los tipos de VPH 1,11,16 y 18.	346 pacientes con diferentes características.	Se observó mayor reactividad para E4 en pacientes trasplantados. Al igual que en pacientes entre los 11 y 20 años. Se observó seroreactividad

and Lutz Gissmann. (1992)	neoplasia cervical CIN I- III 43 mujeres con carcinoma cervicouterino 162 de un hospital universitario sin antecedentes. (VPH, VIH o cáncer)			para E4 tipo 16 en CIN I/II Y poca reactividad en CIN III.
The E4 protein; structure, function, and patterns of expression. John Doorbar. (2013)	Revisión bibliográfica			
Risk stratification of cervical disease using detection of HPV E4 protein and cellular MCM protein in clinical liquid-based cytology samples. Andrew Stevenson, Kin Kavanagh, Jiafeng Pan, et al. (2018)	-Estudio de cohort prospectivo -81 mujeres	Desarrollar un biomarcador (E4 y MCM)viral y celular mediante IHC, aplicado en muestras citológicas.	81 mujeres con CIN I, II	Se encontró E4 más frecuente en CIN I , y MCM en CIN II.

HPV16 and 18 genome amplification show different E4 dependence, with 16E4 enhancing E1 nuclear accumulation and replicative efficiency via its cell cycle arrest and kinase activation functions. Nagayasu Egawa, Qian Wang, Heather M.Griffin et al. (2017)	-Estudio transversal	Entender el papel de la proteína E4, el tipos de alto riesgo.	Queratinocitos isogénicos	Se encontraron diferencias lo que sugiere la importancia del tropismo del virus. EN el tipo 16 , e4 contribuye al ciclo celular y el involucro de esta misma en G2.
--	----------------------	---	---------------------------	---

