



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**COMPARACIÓN PROTEÓMICA DEL EPITELIO CÉRVICO-VAGINAL EN
MUJERES SIN Y CON INFECCIÓN POR VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO
(VPH) DE ALTO RIESGO**

Trabajo Especial de Grado presentado por el **Br. Fernando E. González Flores** como requisito final para optar por el título de Licenciado en Biología

Tutor Científico: **Dra. Flor Herrera**

Tutor Metodológico: **Prof. Mariela Contreras**

Naguanagua, Julio 2016



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

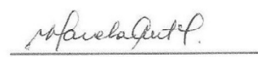


ACTA

Mediante la presente se deja constancia que el (la) **Br. Fernando E. González Flores**, Cédula de Identidad N° **20.107.668**, presentó ante el Jurado aprobado por el Consejo de Departamento de Biología de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (FACYT), de la Universidad de Carabobo, su Trabajo Especial de Grado (T.E.G.), titulado: **"Comparación proteómica del epitelio cérvico-vaginal en mujeres sin y con infección por Virus del Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo"**, en concordancia con los artículos 16, 17, 18 y 19 de las Normas de Interés Estudiantil. El jurado evaluador consideró que, luego de haber aprobado dicho trabajo el (la) bachiller cumple con los méritos académicos necesarios para obtener el Título de Licenciado en Biología.

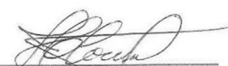
En Valencia, a los quince días del mes de julio del año dos mil dieciseis.


Prof. Flor Herrera
Tutora


Prof. Lellys M. Contreras
Tutora


Prof. Pimeli Felibertt
Jurado Principal




Prof. Heriberto Correia
Jurado Principal

Elaborado por: Dorys Manzanilla.
Julio/2016.

Agradecimiento

A mi familia; mi madre, mis hermanos y mi padre, cuyo apoyo es uno de mis pilares donde puedo apoyarme, por su amor incondicional y por llenar cada día de mi vida con un gran sentimiento de felicidad al tenerlos a mi lado.

A mi novia Angelica Linares, por haberme acompañado en estos años de la carrera y de relación que han sido un viaje extraordinario y por hacerme sentir el joven más afortunado.

A mis amigos con quienes siempre puedo contar en buenas y malas: José Medina, que siempre está dispuesto a prestar de su fuerza en mis momentos de vulnerabilidad. Braulio Ruíz, que con su humor me ayuda a superar mis derrotas. Aura Jiménez, que me ha confiado su amistad y ha sido como una hermana en muchos aspectos. El resto de mis amigos que han estado para compartir los momentos de alegría y frustración a los que aprecio mucho: Alicia Peñaloza, Samuel Escalona, Dimas Gamez, Domingo Garrido, Liaska Cuamo, Emil Hurtado, Daniela López, Magy Romero, Niurka Romero, Gabriel Lovera, Diana Sierra, Laura Lobo, Daniel Orduz, Nazareth Bermudez, Orianita Sánchez, Jessica Salomón; a todos gracias por su amistad.

A la Universidad de Carabobo y a sus profesores, por guiarme, por compartir sus conocimientos y por ser más que educadores, Prof. Carlos Moreno, Eucandis Fuente, Mario Palacio, Zoraida Velasco, Zoraida Fernández, Carmen Andara, Carmen Rodríguez, Carlos Mantilla.

A mis tutores Prof. Flor Herrera y Prof. Mariela Contreras, por saber como guiarme durante la realización y culminación de mi último requisito para graduarme como profesional universitario.

Al personal del BIOMED, que con su ayuda y entrenamiento, sin duda me ayudarán a llegar lejos, Lic. Cesar Pacheco, Yda Méndez, José Rivero, Elianet Useche, Marifel.

Al Doctor Henry Aguiar por facilitar sus servicios durante la toma de muestra y al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) por financiar ésta tesis de grado.

Dedicatoria

Principalmente dedico esta Tesis a mi Madre, quien supo darme el valor de apreciar los gestos de amor que recibimos a diario de aquellos que nos rodean.

También le dedico esta Tesis y los éxitos futuros que me esperen al resto de mi familia, a mi novia y a mis amigos, en quienes sé que contaré con su apoyo y su amor.

A mi Padre cuyo apoyo y amor me han servido para llegar a donde me lo propongo.

A mi querida Abuela, que aunque no está presente en este plano físico, todos aquellos recuerdos de momentos que compartimos y enseñanzas estarán por siempre conmigo.

A mi Tía Sonia, que aunque no está presente en este plano físico, se que estaría orgullosa de las metas que he logrado y las que vendrán por cumplir.

Resumen

La infección por Virus del Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo es una condición mayormente asociada al cáncer de cuello uterino, el cual representa una de las principales causas de muerte en mujeres a nivel mundial. El VPH podría ocasionar cambios del proteoma celular y tales cambios en proteínas podrían ser utilizados como biomarcadores que permitan un diagnóstico más eficaz de infecciones tempranas, especialmente en caso de la sospecha de una infección de alto riesgo. El objetivo de este estudio fue determinar si existen variaciones en la expresión de proteínas constitutivas del tracto genital femenino en presencia del VPH de alto riesgo. El procedimiento empleado fue: a) utilizar el mejor método para coleccionar la muestra entre hisopado y lavado vaginal, b) extraer ADN, amplificar secuencias de VPH y observar el producto por electroforesis c) extraer proteínas de las muestras y d) determinar el proteoma celular mediante electroforesis bidimensional. Se estudió un pool de cuatro muestras sanas y se comparó con otro pool similar de muestras con VPH de alto riesgo. Los resultados indicaron que la toma de muestra con lavado proporciona una mayor cantidad y calidad de ADN en comparación con hisopado tradicional, lo cual podría conducir a diagnósticos moleculares más precisos, ya que se pueden disminuir los falsos negativos. Esto se comprobó cuando se realizaron ensayos para la detección de VPH, en los cuales se determinó que muestras negativas por el método de hisopado fueron positivas por el método de lavado, siendo estos resultados estadísticamente significativos. Los valores de porcentaje de rendimiento de extracción de proteínas fueron muy variables para las muestras que conformaban los pools de muestras sanas e infectadas. Esto pudo deberse al método utilizado y/o por el tipo de muestra empleado. Adicionalmente, se observó, aunque con una resolución media, una diferencia entre los patrones proteicos de las muestras positivas y negativas para VPH lo cual sugiere que la infección por VPH tiene un efecto en la expresión de proteínas encontradas en el fluido cérvico-vaginal.

Palabras clave: Fluido cérvico-vaginal, virus del papiloma humano, electroforesis en dos dimensiones.

Abstract

Virus infection by high risk Human Papilloma Virus (HPV) is a condition most commonly associated with cervical, which represents one of the leading causes of death in women worldwide cancer. HPV may cause cellular proteome changes and such changes in proteins could be used as biomarkers to more effective diagnosis of early infections, especially in case of suspicion of infection of high risk. The aim of this study was to determine whether there are variations in expression of constituting proteins of the female genital tract in the presence of high-risk HPV. The procedure used was: a) use the best method to collect the sample from swab and vaginal washing, b) extracting DNA, amplifying HPV sequences and observe the product by electrophoresis c) extracting proteins from samples and d) determine the cell proteome by two-dimensional electrophoresis. A pool of four healthy samples was studied and compared with a similar pool of samples with high risk HPV. The results indicated that the sample of vaginal washing provides greater source and quality DNA compared to traditional swabbing, which could lead to more accurate molecular diagnostics since they can reduce false negative. This was confirmed when testing for HPV detection in which it was determined that negative samples by swabbing method were positive by washing method, these results were statistically significant. The values of percent yield of protein extraction were highly variable for samples that made up of pools from healthy and infected samples. This might be due to the method used and / or the type of sample used. It was also observed, although to a medium resolution, a difference between the protein patterns of positive and negative samples HPV suggesting that HPV infection has an effect on the expression of proteins found in the vaginal cervical fluid.

Keywords: cervical-vaginal fluid, human papilloma virus, two-dimensional electrophoresis.

Índice general

Contenido	Página
Acta de aprobación.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Resumen.....	v
Abstract.....	vi
1. Introducción.....	1
2. Planteamiento del problema.....	2
3. Justificación.....	3
4. Objetivo general.....	4
4.1 Objetivos específicos.....	4
5. Marco teórico.....	5
5.1 Fluido cérvico vaginal.....	5
5.2 Virus del Papiloma Humano.....	6
5.3 Precipitación de proteínas por adición de acetona.....	8
5.4 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	9
5.5 Electroforesis en dos dimensiones.....	10
6. Antecedentes.....	12
7. Marco metodológico.....	13
7.1 Toma de muestra de Fluido Cérvico-Vaginal (FVC).....	13
7.2 Extracción de ADN de muestras de FCV.....	14
7.3 Precipitación con acetona.....	16
7.4 Procesamiento estadístico de los datos de concentración de ADN.....	17
7.5 Procesamiento estadístico de los datos de ensayos de PCR de VPH.....	18
7.6 PCR para la amplificación de ADN de VPH en las muestras.....	19

7.7 Electroforesis en gel de agarosa al 2%.....	20
7.8 Hibridación en membrana de nylon.....	20
7.9 PCR para la amplificación de ADN de <i>Chlamydia trachomatis</i> y <i>Ureaplasma urealyticum</i> en muestras de VPH positivo y negativo.....	22
7.10 PCR con el Kit STD 6 ACE Detección para la detección de patógenos de transmisión sexual.....	23
7.11 Cuantificación de proteínas por método de Bradford.....	24
7.12 Isoelectroenfoque.....	25
7.13 Tinción con azul de Comassie.....	27
8. Resultados.....	28
8.1 Comparación entre 2 métodos de toma de muestra de cuello uterino.....	28
8.2 Precipitación con acetona.....	33
8.3 Amplificación del ADN de VPH en las muestras y electroforesis en gel de agarosa al 2 %.....	35
8.4 Hibridación en membrana de nylon.....	36
8.5 PCR para la amplificación del ADN de <i>Chlamydia trachomatis</i> y <i>Ureaplasma urealyticum</i> en muestras de VPH positivo, negativo.....	38
8.6 PCR con el Kit STD 6 ACE Detection para la detección de patógenos de transmisión sexual y electroforesis en gel de agarosa 2%.....	40
8.7 Cuantificación de proteínas por método de Bradford y rendimiento de extracción.....	42
8.8 Isoelectroenfoque y tinción.....	44
9. Discusión.....	47
10. Conclusiones.....	55
11. Recomendaciones.....	55
Bibliografía.....	56

Índice de tablas

Contenido	Página
Tabla 1: Determinación de la concentración de ADN en muestras de lavado vaginal.....	29
Tabla 2: Tabla 2: Determinación de la concentración de ADN en muestras de hisopado vaginal.....	29
Tabla 3: Rangos e intervalos de concentración de ADN para las muestras obtenidas por lavado.....	30
Tabla 4: Rangos e intervalos de concentración de ADN para las muestras obtenidas por hisopado.....	30
Tabla 5: Frecuencias observadas para los resultados de PCR de VPH de las muestras de lavado e hisopado.....	32
Tabla 6: Frecuencias esperadas para los resultados de PCR de VPH de las muestras de lavado e hisopado.....	32
Tabla 7: Absorbancia y concentración inicial de proteínas.....	34
Tabla 8: Muestras positivas para VPH con sus genotipos.....	37
Tabla 9: Concentración de proteínas antes y después de precipitar, en muestras infectadas.....	43
Tabla 10: Concentración de proteínas antes y después de precipitar, en muestras sanas.....	43
Tabla 11: Cantidad de proteínas totales y porcentaje de rendimiento para las muestras infectadas.....	44
Tabla 12: Cantidad de proteínas totales y porcentaje de rendimiento para las muestras sanas.....	44
Tabla 13: Intervalos de relación 260/280 nm para muestras de lavado e hisopado.....	47

Índice de figuras

Contenido	Pagina
Figura 1: Fórmula para el cálculo del estadístico Z.....	31
Figura 2: Fórmula para el cálculo del estadístico Ji-cuadrado.....	33
Figura 3: Fórmula para el cálculo de grados de libertad para la prueba de Ji-cuadrado.....	33
Figura 4: Determinación de VPH por PCR.....	36
Figura 5: Gel de agarosa 2% del producto de la PCR de Chlamydia.....	38
Figura 6: Gel de agarosa 2% del producto de la PCR de Ureaplasma.....	40
Figura 7: Gel de agarosa al 2% del producto de la PCR del kit STD 6 ACE detection para las muestras sanas.....	41
Figura 8: Gel de agarosa del producto de la PCR del kit STD 6 ACE detection para las muestras infectadas.....	42
Figura 9: Gel de IEF en 2 dimensiones de los patrones de muestras de VPH – en comparación con patrones de muestras de VPH +.....	46

1.- INTRODUCCIÓN

El tracto genital femenino es un complejo órgano el cual está expuesto constantemente a microorganismos que condicionan la aparición de infecciones, los cuales ingresan a través del área más externa del tejido (Quayle, 2002), sin embargo, las incidencias de infecciones son relativamente escasas debido a que el tracto genital femenino ha desarrollado efectivos mecanismos de defensa (Zegels *et al.*, 2009). Entre estos mecanismos destaca la presencia de una mucosa secretada a través de glándulas que recubren el tejido del exocérnix (Zegels *et al.*, 2009). Ésta mucosa es denominada fluido cérvico-vaginal (FCV) y previene la infección causada por microorganismos perjudiciales que ingresen al tracto genital femenino mediante el lavado de la superficie de las células epiteliales o por la acción de las proteínas con función inmuno-defensiva presentes en el mismo (Zegels *et al.*, 2009). El FCV posee una gran importancia diagnóstica en el campo de la ginecología ya que en dicho fluido se encuentran proteínas encargadas de la defensa y respuesta inmune del tracto genital femenino. Estas proteínas pueden presentar cambios en sus niveles de expresión debido a una infección determinada (Di Quinzo *et al.*, 2007).

Entre los microorganismos más perjudiciales para la salud de la mujer se encuentra el virus del papiloma humano (VPH), específicamente aquellos con genotipos de alto riesgo, denominados así por las variaciones genómicas que poseen en comparación con otras cepas y la producción lesiones intraepiteliales que pueden evolucionar en neoplasias o carcinomas (Cruz *et al.*, 2013). El VPH causa una enfermedad de transmisión sexual ampliamente distribuida a nivel mundial, con una alta frecuencia (44 %) (Atencio, 2008). Las estadísticas proporcionadas por El Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos de América (CDC, siglas en inglés) en el 2013 mostraron que la prevalencia de infecciones con VPH a nivel mundial permanece en 42,5 % (Center for Disease Control and Prevention, 2015).

Se ha demostrado que el VPH es responsable de producir lesiones que generalmente anteceden al cáncer del cuello uterino. Las cuales podrían alterar la regulación de los mecanismos enzimáticos que tienen distintas funciones en el tracto genital femenino (Raemdonck *et al.*, 2014). Esta posible alteración podría reflejarse en cambios del proteoma celular, el cual es muy dinámico y depende de la expresión de proteínas constitutivas e inducibles. Tal expresión es medida de la capacidad de respuesta celular a los estímulos del entorno. Para lograr comparar la expresión de las proteínas presentes en el FCV en presencia y ausencia de infecciones por VPH éste proyecto emplea la electroforesis en dos dimensiones o bidimensional. Esta técnica es ampliamente utilizada en proteómica para separar proteínas en función de su punto isoeléctrico y su masa molecular (Voet *et al.*, 2007). Con este método, es posible identificar con gran sensibilidad un conjunto de proteínas expresadas por una célula frente a diferentes tipos de condiciones experimentales (Voet *et al.*, 2007).

2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El tracto genital femenino incluye la vagina y el cuello uterino. Este órgano es una zona propensa a ser invadida por patógenos y por ende, desarrollar infecciones. Esos patógenos entran a las células del epitelio genital a través de las mucosas segregadas por dichas células sin embargo, la incidencia de estas infecciones es relativamente baja debido a que el tracto genital femenino cuenta con un mecanismo de defensa que consiste en flora bacteriana benéfica propia y así como proteínas con actividad inmuno-defensivas. Las proteínas halladas en las mucosas del epitelio vaginal son numerosas, poseen diferentes tipos de funciones, y su expresión está sujeta a variaciones entre individuos y a otros factores biológicos como el nivel de higiene, edad, menstruación, embarazo, relaciones sexuales recientes y la presencia de infecciones bacterianas o virales (Zegels *et al.*, 2009).

El fluido cérvico-vaginal posee una gran importancia diagnóstica en el campo de la ginecología ya que en dicho fluido se encuentran proteínas encargadas de la defensa y respuesta inmune del tracto genital femenino. Estas proteínas pueden presentar cambios en sus niveles de expresión debido a una infección determinada (Di Quinzo *et al.*, 2007)

El Virus del Papiloma Humano (VPH) se asocia a la neoplasia intraepitelial cervical, lesión que generalmente antecede al cáncer del cuello uterino. Este tipo de cáncer es una de las principales causas de muerte en mujeres a nivel mundial (Zelada y Fando, 2013). El VPH también se asocia a la aparición de otros tipos de cáncer, algunos de estos en otros epitelios como la boca, pene, vulva, ano y faringe (Atencio, 2008; Soria *et al.*, 2013). Por otra parte las infecciones por VPH podrían alterar la regulación de los mecanismos enzimáticos que tienen distintas funciones en el tracto genital femenino (Raemdonck *et al.*, 2014). Esta posible alteración podría reflejarse en cambios del proteoma celular, el cual es muy dinámico y depende de la expresión de proteínas constitutivas e inducibles. Tal expresión se relaciona directamente con la capacidad de respuesta celular a los estímulos del entorno (Zegels *et al.*, 2009).

En este estudio se determinaron posibles variaciones en la expresión de proteínas constitutivas del tracto genital femenino en presencia del VPH de alto riesgo.

3.- JUSTIFICACIÓN

Con la realización de este estudio puede determinar la posible variación en la expresión de las proteínas constitutivas del tracto genital femenino, como consecuencia del mecanismo de interacción del VPH con las células del hospedador al momento de la transformación celular. De encontrarse diferencias

significativas en la expresión de una o varias proteínas por parte de las células infectadas con VPH de alto riesgo con respecto a las células sanas, se demostraría una alteración a nivel del genoma de la célula hospedadora. Esta información podría ser usada en la formación de un modelo que explique en detalle las vías metabólicas que sigue una célula normal para transformarse en un tumor maligno en presencia del VPH. Además, se permitiría el desarrollo de técnicas que permitan monitorear el estado y la progresión de una lesión intraepitelial, a fin de tomar las medidas de prevención y tratamiento necesarias. Por otra parte, futuros estudios pueden ser dirigidos a la identificación de proteínas cuya expresión presente la mayor variación entre las células infectadas con VPH de alto riesgo con respecto a las células sanas. Estas proteínas podrían ser utilizadas como biomarcadores, permitiendo un diagnóstico más efectivo en el caso de infecciones en estadios tempranos, especialmente en caso de la sospecha de una infección de alto riesgo.

4.- EL OBJETIVO GENERAL

Comparar la expresión de proteínas del epitelio vaginal y cervical en mujeres con y sin infección por VPH.

4-1 Objetivos Específicos

- Determinar entre el lavado vaginal y el hisopado vaginal cual es el mejor método para toma de muestras del cuello uterino.
- Optimizar la extracción de proteínas del epitelio vaginal y cervical.
- Optimizar la separación de proteínas del epitelio vaginal y cervical mediante una electroforesis en 2 dimensiones (isoelectroenfoque-PAGE).

- Comparar el perfil proteico del epitelio vaginal y cervical sin VPH y con VPH de alto riesgo.

5.- MARCO TEÓRICO

5.1 El Fluido cérvico-vaginal

El tracto genital femenino es un complejo órgano el cual se encuentra subdividido en 3 áreas que desde la más externa hasta la más interna son: a) La vagina infértil y exocérvis; b) El endometrio fértil y las trompas de Falopio; y c) El endocérvis (Quayle, 2002). El tracto genital femenino es propenso y está expuesto constantemente a agentes patógenos que entran a través del área más externa (vagina y exocérvis). Sin embargo, las incidencias de infecciones son relativamente escasas debido a que el tracto genital femenino ha desarrollado un efectivo mecanismo de defensa (Zegels *et al.*, 2009). Este mecanismo de defensa consiste en: a) Una flora bacteriana asociada que inhibe el crecimiento de bacterias patógenos; b) Presencia de Linfocitos T e inmunoglobulinas de tipo A e IgG; y c) La secreción de una mucosa a través de glándulas que recubren el tejido del exocérvis (Zegels *et al.*, 2009). La mucosa secretada por el exocérvis es denominada fluido cérvico-vaginal y previene la infección causada por los patógenos que entren al tracto genital femenino. Esto es posible mediante el lavado de la superficie de las células epiteliales o por la acción de las proteínas presentes en el fluido (Zegels *et al.*, 2009). Estas proteínas pueden presentar cambios en sus niveles de expresión debido a una infección determinada (Di Quinzo *et al.*, 2007). Los cambios en la expresión de las proteínas del fluido cérvico-vaginal en muestras con sospecha o confirmación de una infección, conducen a la elaboración de estudios que permiten la búsqueda de biomarcadores eficientes para el diagnóstico temprano de dichas infecciones (Di Quinzo *et al.*, 2007; Mitra y Beigi, 2015).

Otras características del fluido cérvico-vaginal que lo hacen ideal para los estudios de proteómica son, la facilidad de recolección de la muestra (sin necesidad de métodos invasivos para la paciente) (Raemdonck *et al.*, 2014) y por otra parte, que el órgano reproductor femenino es el que desencadena la respuesta inmune presente en la muestra (Zegels *et al.*, 2009). Se ha demostrado que, al igual que las mucosas secretadas por el epitelio gastrointestinal, las mucosas del epitelio del tracto genital femenino poseen proteínas con actividad antimicrobiana e inmunológica (Quayle, 2002). Algunas de las proteínas y péptidos con actividad antimicrobiana en el fluido cérvico vaginal son las defensinas, lactoferrina, catelidicina, lisozimas y las antileucoproteinasas (Zegels *et al.*, 2009). Las proteínas que se hallan comúnmente en el fluido cérvico-vaginal son denominadas proteínas constitutivas. La expresión de las proteínas constitutivas puede variar entre mujeres debido a la acción de diversos factores como la edad, etapa en el ciclo menstrual, presencia de embarazo, frecuencia de relaciones sexuales y presencia de infecciones con patógenos de transmisión sexual como la *Chlamydia tracomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, Virus de Inmunodeficiencia Humana, Virus del Papiloma Humano, entre otros (Zegels *et al.*, 2009).

5.2 Virus del Papiloma Humano

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es un virus de ADN de doble cadena que pertenece a la familia *Papillomaviridae* del Género *Papillomavirus*. Este virus se caracteriza por poseer un genoma con marcos de lectura abiertos (ORF's) que codifica la expresión de 7 proteínas no estructurales tempranas (E1-E7) y 2 proteínas estructurales tardías (L1 y L2) (Cruz *et al.*, 2013). Se ha evidenciado que durante el acto sexual con un individuo infectado, el microtrauma del epitelio genital (en particular en la zona en transformación del epitelio cervical) expone a las células basales ante el virus, permitiendo la unión entre las glicoproteínas receptoras de la célula basal con la proteína de la cápside viral L1 (Rivera *et al.*, 2009; Sanabria, 2009; Lopez y Lizano, 2006). Estos receptores son las integrinas

α -6 y heparán sulfato (Sanabria, 2009; Lopez y Lizano, 2006), éste último está asociado para algunos tipos de VPH de alto riesgo (Knappe *et al.*, 2007; Rivera *et al.*, 2009; Dasgupta *et al.*, 2011).

El VPH está clasificado en aproximadamente 100 genotipos (debido a las variaciones en su genoma) que a su vez, se clasifican en 2 grupos; alto y bajo riesgo. El VPH causa una enfermedad de transmisión sexual ampliamente distribuida a nivel mundial, con una alta frecuencia (44%) (Atencio, 2008). Las estadísticas proporcionadas por El Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos de América CDC (siglas en inglés) en el 2013 mostraron que la prevalencia de infecciones con VPH a nivel mundial permanece en 42,5% y que esta incidencia está sujeta a factores culturales y económicos (Center for Disease Control and Prevention, 2015). Las infecciones por VPH producen lesiones similares a verrugas (condición conocida como condiloma acuminado) en las mucosas del epitelio (boca, pene, vagina y ano). Cuando las lesiones presentan esta naturaleza se les clasifica dentro del grupo de VPH de bajo riesgo pero cuando las lesiones evolucionan en una neoplasia o carcinoma se clasifica dentro del grupo de VPH de alto riesgo (Cruz *et al.*, 2013).

Las infecciones por VPH de alto riesgo son responsables de la aparición de tumores en la zona ano-genital e incluso faríngea en el ser humano. En mujeres producen cáncer de cuello uterino siendo éste, el agente principal de mortalidad femenina a nivel mundial (Carrillo *et al.*, 2010). Cerca del 90% de las biopsias de cáncer cervical son positivas en los ensayos de detección de VPH (Zelada y Fando, 2013). Cuando los oncogenes E6 y E7 del VPH interactúan con el genoma de la célula huésped ocurre la transformación de una célula normal a una célula maligna. La proteína E6 está implicada en la inhibición de la apoptosis alterando los mecanismos dependientes e independientes de *p53* (Lizano *et al.*, 2009); mientras que la proteína E7 se une y desestabiliza a la proteína supresora de tumores Rb (pRb) evitando la inactivación de la proteína E2F. Esta falta de

inactivación trae como consecuencia la alteración de los complejos que permiten la replicación del ADN, división acelerada de las células y sobre expresión del producto del gen *cdkn2A* (la proteína $p16^{\text{INK4A}}$) (Rangel *et al.*, 2013; Aguilar, 2014). La proteína $p16$ induce al paro del ciclo celular a través de $p53$, pero las proteínas virales E6 y E7 degradan a $p53$ e interfieren con pRb , permitiendo que se omita el proceso de paro del ciclo celular y continúe la proliferación a pesar de los altos niveles de $p16$ (Smith *et al.*, 2010; (Rangel *et al.*, 2013; Lizano *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que en infecciones con VPH de alto riesgo existe una sobre expresión de la proteína $p16^{\text{INK4A}}$ en células epiteliales infectadas lo cual la hace un biomarcador eficiente para el diagnóstico de VPH (Smith *et al.*, 2010; Raemdonck *et al.*, 2014).

Las proteínas E6 y E7 también pueden alterar el funcionamiento normal de pequeñas secuencias de ARN denominadas micro ARN (miRNA) que regulan la expresión post transcripcional de algunos genes (Honegger *et al.*, 2015). Entre estos genes se encuentran algunos que juegan un papel fundamental en el ciclo celular, por lo que estos miRNA tienen una función supresora de tumores, pero al estar alterados por la actividad de las proteínas E6 y E7 pasan a ser miRNAs con actividad oncogénica (Honegger *et al.*, 2015).

Otro cambio que produce el VPH en las células del huésped es la hipermetilación del genoma generando el silenciamiento diversas secuencias de genes que pueden alterar la expresión de las proteínas traducidas por esos genes (Schlecht *et al.*, 2014).

5.3 Precipitación de proteínas por adición de Acetona

Una proteína se compone de uno o más polipéptidos plegados y enrollados en conformaciones específicas que a su vez están compuestos de polímeros de

aminoácidos. Los aminoácidos son moléculas orgánicas portadoras de grupos carboxilo y amino, unidos a un átomo de hidrógeno y un grupo variable simbolizado por la letra R (Campbel y Reece, 2007). Los grupos carboxilo y amino al ser ionizables les confieren propiedades de polielectrolitos anfóteros a las proteínas. En pocas palabras, las proteínas pueden variar sus propiedades eléctricas dependiendo en el medio en que se encuentran disueltas, actuando como cationes complejos, zwitteriones y aniones proteicos (Macarulla y Goñi, 2002).

Estas propiedades han sido de utilizadas en procesos de aislamiento y purificación al permitir una precipitación selectiva de las proteínas. La precipitación selectiva de una proteína viene dada por el grado de solubilidad que posee en un medio determinado, la cual depende de la fuerza y, composición iónica, pH, distribución y proporción de grupos hidrófilos polares e hidrófobos no polares y la temperatura (Macarulla y Goñi, 2002). Al estar en una solución polar como el agua pura, los grupos polares de la proteína interactúan con las moléculas de agua, aumentando su solubilidad, impidiendo la formación de agregados proteicos, pero con la adición de solventes orgánicos menos polares que el agua y miscibles en esta, se puede disminuir la constante dieléctrica del solvente (en este caso agua) desplazando las moléculas de agua asociadas con la proteína. Solventes orgánicos como la acetona o el etanol disminuyen el grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de la molécula proteica, permitiendo la formación de agregados y disminución de la solubilidad de las proteínas que trae como consecuencia su precipitación, convirtiendo este método en una herramienta de purificación de proteínas, rápida, económica y sencilla (Macarulla y Goñi, 2001).

5.4 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

El método de Bradford es un método sensible y económico que permite la cuantificación de proteínas totales de una muestra. Este método utiliza el colorante

Azul Brillante de Coomassie G-250 que produce 2 coloraciones, una roja y otra azul. La forma roja se convierte en azul después de la unión del colorante a una proteína, formando un complejo colorante-proteína que posee un alto coeficiente de extinción lo que le confiere gran sensibilidad al método (Voet *et al.*, 2007). El complejo colorante-proteína se forma por la unión específica del reactivo con los residuos Arg, Trp, Tyr, His y Phe de las proteínas, el cual presenta un máximo de absorción de luz de 595 nm (Bradford, 1976). Mediante una curva de calibración utilizando concentraciones conocidas de una proteína patrón (albúmina de suero bovino, BSA) se puede conocer la concentración de la proteína problema (Voet *et al.*, 2007).

5.5 Electroforesis en dos dimensiones

La electroforesis en dos dimensiones o bidimensional es una técnica utilizada en proteómica para separar proteínas en función de su punto isoeléctrico y su masa molecular. Con este método, es posible identificar con gran sensibilidad un conjunto de proteínas expresadas por una célula (Voet *et al.*, 2007). Para lograr una eficiente separación de proteínas la electroforesis bidimensional se divide en 3 pasos: 1) el enfoque isoeléctrico (primera dimensión); 2) el equilibrado y 3) la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) (Gög, 2004; Görget *al.*, 2007; BioRad®, 2001). En la electroforesis por enfoque isoeléctrico o isoelectroenfoco, las proteínas son tratadas con compuestos que reúnen ciertas condiciones químicas y eléctricas como agentes reductores, agentes caotrópicos (urea y tiourea), detergentes no iónicos y una solución tampón, los cuales permiten la desnaturalización de las proteínas sin alterar las cargas eléctricas originales ni el pH de las mismas (Gög, 2004; Görget *al.*, 2007; BioRad®, 2001). Una vez iniciada la primera dimensión las proteínas con cargas netas positivas y negativas migrarán en un campo eléctrico hasta que alcancen su punto isoeléctrico en el cual permanecerán inmóviles. Este campo eléctrico se establecerá en un gel de poliacrilamida especial que posee un gradiente de pH

que varía desde un extremo básico hasta uno ácido debido a la integración de compuestos químicos unidos a la matriz del gel (Gög, 2004; Görget *al.*, 2007; BioRad®, 2001). Este gradiente de pH puede ser modificado para establecer un rango de separación mediante el uso de pequeños polímeros de carga múltiple llamados polianfolitos, que también permiten aumentar la solubilidad de las proteínas en las tiras de isoelectroenfoque al impedir la formación de agregados proteicos debido a las interacciones de los grupos cargados (Gög, 2004; Görget *al.*, 2007; BioRad®, 2001).

Una vez culminada la primera dimensión, las proteínas deben ser sometidas a un proceso de equilibrado antes de ser separadas en función de su peso molecular, para ello, son tratadas con el detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS) para modificar su carga negativamente; además las proteínas son tratadas con compuestos como el ditioneitol (DTT) y la iodoacetamida para reducir y alquilar puentes de sulfuro y grupos sulfhídricos (respectivamente) (Görg *et al.*, 2007). Una vez finalizado el equilibrio, las proteínas son separadas en función de su peso molecular en la segunda dimensión, utilizando un diferencial de voltaje en dirección perpendicular con respecto al gel de la primera dimensión. Para finalizar una electroforesis bidimensional y observar los resultados del estudio en cuestión, se puede resumir el paso final en los siguientes protocolos: A) tinción, al utilizar un colorante que posea afinidad por las proteínas como el azul de comassie o el nitrato de plata; B) revelado donde el gel teñido es tratado con soluciones de compuestos químicos que remueven el exceso de colorante del gel, dejando solo teñidas a las proteínas; C) fotografiar y analizar, utilizando un densitómetro que pueda tomar una fotografía del gel creando una imagen digital del mismo la cual pueda ser analizada por un software integrado al equipo que permita establecer una relación o patrón en la separación de los puntos que representan a las proteínas y emitir una conclusión basada en la significancia del posterior análisis estadístico realizado por el mismo software (Gög, 2004; Görget *al.*, 2007; BioRad®, 2001).

6.- ANTECEDENTES

Raemdonck y colaboradores en el 2014 en su trabajo titulado *Identification of Protein Biomarkers for Cervical Cancer Using Human Cervicovaginal Fluid*, identificaron por espectrofotometría de masa proteínas expresadas en el fluido cérvico-vaginal en pacientes con infecciones de VPH de alto y bajo riesgo, que pueden ser utilizadas como biomarcadores de diagnóstico. Entre las cuales las más prometedoras fueron alfa-actinina-4 y las isoenzimas piruvato quinasas M1 y M2.

Zegels y colaboradores en el 2009 analizaron las proteínas encontradas en el fluido cérvico vaginal en el trabajo titulado *Comprehensive proteomic analysis of human cervical-vaginal fluid using colposcopy samples*, demostrando que existe variación entre las proteínas expresadas por cada paciente pero que la expresión de proteínas con actividad anti-microbiana y de defensa como beta-defensina humana 2, catiledicina, glicodelina y la ribonucleoproteína A permanece constante. Entre las proteínas encontradas mencionan.

Quayle (2002) en su trabajo titulado *The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells*, explicó las características y propiedades de las proteínas encontradas en el fluido cérvico vaginal con actividad inmuno-defensiva en presencia de patógenos.

Schlecht y colaboradores en su trabajo del 2014 titulado *Epigenetic changes in the CDKN2A locus are associated with differential expression of P16INK4A and P14ARF in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma*, demostraron que en infecciones de VPH de alto riesgo la líneas celulares infectadas presentaron cambios epigenéticos relacionados con la hiper-metilación del genoma produciendo cambios en la expresión de algunas proteínas.

Sartor y colaboradores (2011) en su trabajo titulado *Genome-wide methylation and expression differences in HPV(+) and HPV(-) squamous cell carcinoma cell lines are consistent with divergent mechanisms of carcinogenesis*, demostraron que las líneas celulares infectadas con VPH de alto riesgo presentaron una hipermetilación en su genoma lo que conlleva a la formación de un tejido maligno a diferencia de otras líneas celulares de tejidos malignos que no estaban infectados con VPH.

7.- MARCO METODOLÓGICO

7.1 Toma de muestras de Fluido Cérvico-Vaginal (FCV)

Se comparó entre 2 métodos de recolección de muestras de fluido cérvico-vaginal, estos fueron: El hisopado tradicional y el lavado vaginal. El hisopado se caracteriza por la introducción de un hisopo estéril al saco vaginal posterior y al canal endocervical para extraer el fluido cérvico-vaginal con movimientos rotatorios suaves (Méndez, 2012).

El método de lavado se caracteriza por ser un método alternativo que consiste en introducir al cuello uterino una jeringa con agua estéril o solución fisiológica (NaCl 80 %; pH 7) con la cual se lavan las paredes del mismo para la extracción de fluido, posteriormente se introduce un hisopo estéril y se pasa con movimientos rotatorios suaves sobre el área previamente lavada (Aguilar, Comunicado personal). Esta alternativa de lavado-hisopado supone una mayor extracción de muestra (fluido) para diagnósticos.

Se recolectaron 100 muestras que pertenecieron a mujeres que firmaron voluntariamente un consentimiento informado dado por el Comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED). Las muestras consistieron en una mezcla de solución salina de lavado y fluido cérvico-vaginal (~4mL), éstas

fueron recolectadas en el laboratorio clínico CienPlus Salud C.A., ubicado en Maracay Edo. Aragua.

Las muestras procesadas en la investigación debían cumplir con un criterio de inclusión principal que fue de: a) Un grupo de 4 muestras positivas para infecciones por VPH únicamente de alto riesgo, b) Un grupo de 4 muestras negativas para infección por VPH y c) Sin presencia de infecciones de otro tipo de patógenos de transmisión sexual, para garantizar que la respuesta inmune del tracto genital femenino, como las posibles variaciones del proteoma estuvieran influenciadas por el VPH. El objetivo de poseer un grupo de 4 muestras para cada condición fue para organizarlas en pools garantizar obtener la mayor cantidad de proteínas para los ensayos de electroforesis en dos dimensiones.

Cumplido el criterio de inclusión principal se plantearon los siguientes criterios de inclusión secundarios: a) Seronegatividad para infección por VIH, b) sin lesiones intraepiteliales, c) edad reproductiva entre 25-35 años, d) sin tratamiento hormonal, e) no embarazadas y f) sexualmente activas pero sin relaciones sexuales 48 horas antes de la toma de muestra.

Para definir el éxito de ambos métodos se utilizaron los siguientes parámetros: a) Cantidad de ADN recolectado; b) Calidad del ADN recolectado; c) Los resultados en ensayos de PCR, incluyendo la reducción de falsos negativos y d) la concentración de proteínas totales que proporcionaron un método con respecto al otro.

7.2 Extracción de ADN de muestras de FCV

Se realizó una extracción de ADN de aproximadamente 1 µL de solución de FCV para las 100 muestras recolectadas por ambos métodos para realizar los análisis de comparación. Primero con una pinza de metal se sujetó el hisopo dentro del tubo y se agitó la solución para homogenizar y se retiró el hisopo,

asegurándose de limpiar los restos de solución con las paredes del tubo. Se tomaron 400 µL de muestra y se depositaron en tubos eppendorf (el resto del material fue identificado y almacenado en nevera). Se agregaron a las muestras 450 µL de tampón de extracción de ADN (Tris-HCl 50mM, EDTA 2mM, pH 8,0) y 30 µL de proteinasa K. Se mezclaron en vórtex hasta que la solución se observó turbia. Luego se incubaron los tubos a 55 °C en baño de María durante 1 hora. Una vez finalizado el tiempo de incubación se clarificó la solución mediante una centrifugación rápida y se agregaron 300 µL de fenol-cloroformo. Después se realizó un toque de vortex y se centrifugaron las muestras a 793,5 g durante 5 minutos. Al finalizar el tiempo, se tomó el sobrenadante de cada solución y trasvasó a otro tubo identificado al que se le agregaron 300 µL de fenol-cloroformo (para cada muestra). Se homogenizó en el vórtex, se centrifugaron las muestras a 793,5 g durante 5 minutos y se tomó el sobrenadante (con cuidado de no arrastrar parte de la interfase) y se trasvasó a un tubo (esto se realizó para todas las muestras). Luego a los nuevos tubos se les agregó 300 µL de cloroformo y se centrifugaron nuevamente a 793,5 g durante 5 minutos. Al finalizar el tiempo se trasvasó el sobrenadante a un nuevo tubo identificado (esto se realizó para cada muestra) y se le agregaron 700 µL de etanol al 100 % más 30 µL de NaCl (5M), luego se agitó por inmersión y se refrigeraron las muestras en un congelador a -20 °C durante 12 horas.

Al finalizar las 12 horas se centrifugaron las muestras a 20.160 g durante 15 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante con mucho cuidado. Luego se realizó un lavado con etanol al 70 %, se mezcló por inmersión y se centrifugó a 20.160 g durante 7 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Las muestras se dejaron secar en un concentrador al vacío durante 15 minutos, luego fueron resuspendidas en 70 µL de H₂O libre de nucleasas y se dejaron en reposo durante 30 minutos. Por último se midió la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro para determinar la calidad y concentración de ADN.

7.3 Precipitación con Acetona

Las muestras de FCV recibidas en el laboratorio estaban contenidas en tubos de 10 mL. Estos Tubos contenían ~4 mL de solución de lavado con fluido cérvico-vaginal y el hisopo. Los tubos fueron centrifugados a 15.000 g durante 2 minutos con el fin de separar la mucosidad de la solución, y se tomaron alícuotas de 500 μ L (4 o 6 alícuotas para 2 y 3 mL, respectivamente), reservando 1 mL para la determinación de VPH, genotipo e infecciones comunes.

Paralelamente, se tomaron 20 μ L de una de las fracciones para realizar una medición de absorbancia a 280 nm y obtener una concentración parcial de proteínas. Por otra parte, la alícuota de 20 μ L fue utilizada para un ensayo de Bradford para determinar el rendimiento de la extracción. Se precipitaron las fracciones añadiendo el doble de volumen de acetona pura fría (1000 μ L) y se dejaron incubando por 24 horas. Una vez transcurridas las 24 horas, se centrifugaron las fracciones por 20 minutos a 20.160 g. El precipitado obtenido fue lavado y resuspendido en 250 μ L de acetona al 80% para lavar las sales. Adicionalmente, se realizó otra medición de absorbancia a 280 nm del sobrenadante para comprobar el éxito de la precipitación. Luego el precipitado resuspendido se trasvasó en otro de los tubos que contenía una fracción de proteínas precipitadas y fue resuspendido de la misma forma para finalmente unir todas las fracciones en un solo tubo. Las muestras dejaron incubado durante 1 hora en nevera a -20°C. Luego los tubos con sus respectivas fracciones fueron centrifugados a 20.160 g durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Para asegurarse de obtener un mejor lavado de las sales se realizó otro lavado con acetona al 80% y se repitieron los 2 últimos pasos. Finalmente, el precipitado obtenido fue resuspendido en 10 μ L de acetona pura fría y almacenado a -20 °C.

7.4 Procesamiento estadístico de los datos de concentración de ADN

Para evaluar cual de los métodos permite mayor recolección de ADN se recurrió a la prueba estadística de Wilcoxon-Mann-Whitney, la cual es una prueba no paramétrica utilizada para evaluar si 2 grupos independientes fueron extraídos de la misma población partiendo bajo el supuesto de que un grupo "X" es mayor que el otro (Siegel y Castellan, 1998). Se seleccionaron 95 de las muestras recolectadas debido a que las primeras 5 muestras fueron recolectadas únicamente por el método de lavado (aunque esto no afectó la decisión de utilizarlas para determinar presencia de infección por VPH) y no tenían su contra parte tomada por hisopado para comparar.

Para realizar esta prueba, primero se establecieron las categorías de grupo "X" y "Y" en los que las muestras obtenidas por lavado fueron el grupo "X" (el cual se supone que es mayor) y las muestras obtenidas por el método de lavado fueron el grupo "Y". Después los valores de concentraciones de ADN de las muestras recolectadas por ambos métodos fueron organizados de menor a mayor. Luego se les asignaron rangos a los valores de concentración de ADN de ambas categorías (o métodos) en los que al menor valor de concentración de ADN le correspondería el rango de "1" y al siguiente valor de concentración de ADN le correspondería el rango de "2" y así sucesivamente para todos los valores de concentración de ADN. En caso de haber "empates" valores iguales de concentración de ADN se realizó una sumatoria de los rangos a los que corresponden esas concentraciones de ADN empatadas y se dividieron entre el número de rangos (por ejemplo los rangos 1; 2 y 3 corresponden a 3 muestras con la misma concentración de ADN, si se suman 1 más 2 más 3 es igual a 6, el cual se divide entre el número de rangos que poseían la misma concentración que eran 3, da igual a 2, por lo que el rango que se le asignaría a las 3 muestras con la misma concentración sería de 2).

Luego se realizó una sumatoria de todos los rangos para ambas categorías, si ambas sumatorias resultaran en valores similares indicarían que el supuesto de

que una muestra es mayor que otra no se cumplió. Se propusieron el contraste de hipótesis donde, la hipótesis nula (H_0) planteó que ambos métodos recolectan la misma cantidad de ADN, mientras que la hipótesis alternativa (H_1) planteó que el método de lavado recolecta la mayor cantidad de AND y se fijó el valor crítico (α). Después se calculó el estadístico de Wilcoxon Mann-Whitney con su respectiva fórmula para determinar la probabilidad asociada y compararla con el α . Cuando la probabilidad asociada es menor que α se rechaza la hipótesis nula y si es mayor, se mantiene.

7.5 Procesamiento estadístico de los datos de ensayos de PCR de VPH

Para evaluar cual de los métodos permite una mejor detección de infecciones de VPH, minimizando la aparición de falsos negativos se recurrió a la prueba de Ji-cuadrado para 2 muestras independientes, la cual es una prueba no paramétrica que plantea la hipótesis de que se pueden separar los sujetos de estudio (las muestras) en grupos diferentes basados en una interacción causada por una de las variables (el resultado del ensayo de PCR) (Siegel y Castellan, 1998). Para probar esta hipótesis se cuentan el número de casos de cada grupo que caen en las distintas categorías y se compara con la proporción de casos de un grupo de las distintas variables, con la proporción de casos del otro grupo en las mismas variables. Si las proporciones son las mismas entonces no hay interacción, en caso contrario, hay una interacción (Siegel y Castellan, 1998). Al igual que en la sección 7.4, se seleccionaron 95 de las muestras, por la misma razón.

Para realizar esta prueba, primero se tomaron los datos de la cantidad de resultados positivos y negativos para los ensayos de PCR de las muestras recolectadas por ambos métodos para formar las frecuencias observadas. Con los valores de frecuencias observadas se calcularon las frecuencias esperadas. Para calcular la frecuencia de resultados positivos esperados para el método de lavado se multiplicó la sumatoria de resultados positivos y negativos del método de

lavado por el total de resultados positivos y se dividió entre el total de muestras recolectadas y para determinar la frecuencia esperada de resultados negativos esperados para este método, se multiplicó nuevamente la sumatoria de resultados positivos y negativos del método de lavado por el total de resultados negativos y se dividió entre el total de muestras recolectadas (este paso se realizó para calcular también la frecuencia de resultados esperados para el método de hisopado utilizando sus respectivos valores de resultados observados).

Posteriormente se estableció el contraste de hipótesis donde, la hipótesis nula (H_0) planteó que ambos métodos obtienen resultados similares para ensayos de PCR de VPH, mientras que la hipótesis alternativa (H_1) planteó que el método de lavado obtiene mejores resultados en ensayos de PCR y se fijó el valor crítico (α). Después se calculó el estadístico de Ji-Cuadrado para 2 muestras independientes con la fórmula respectiva, se determinó su probabilidad asociada y se comparó con α . Cuando la probabilidad asociada es menor que α se rechaza la hipótesis nula y si es mayor, se mantiene.

7.6 PCR para la amplificación del ADN de VPH en las muestras

Este ensayo se realizó para las 100 muestras recolectadas por ambos métodos durante el proyecto (para cumplir con el criterio de inclusión principal). Se preparó una solución de reacción conformada por la mezcla de Tampón de reacción 1X (KCl 10 mM, Tris-HCl 2 mM pH 9,0), dNTP 0,22 mM, $MgCl_2$ 1,33 mM, los cebadores MY09 y MY11 0,066 pmol/ μ L (c/u) (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3' y 5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3', respectivamente, que amplifican la región L1 del genoma viral (Depuydt *et al.*, 2007)), HLADQ 0,066 pmol/ μ L, y Taq-ADN polimerasa 0,028 U/ μ L (Go Taq[®] DNA polymerase Promega); en un volumen final de 22,5 μ L (el cual se alcanzó mezclando los componentes de la reacción con agua desionizada). A uno de los tubos no se le añadió ADN para ser utilizado como control negativo (PCRmix),

mientras que a los demás se les añadió la cantidad necesaria de ADN (para completar el volumen final de 25 µL) proveniente de las muestras de VPH positivo de alto riesgo. Al último tubo se le añadió la cantidad necesaria de una muestra de ADN de VPH16 para ser utilizada como control positivo. Seguidamente, se inició la reacción de PCR con un ciclo de desnaturalización a 94° C por 4 min; de 2 a 40 ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación a 94 °C por 15 seg, 55 °C por 30 seg y 72 °C por 45 seg respectivamente.

Para comprobar que la muestra de ADN fue amplificada con éxito se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% m/v, con un marcador de tamaño molecular conocido para comprobar la presencia o ausencia de ADN del VPH.

7.7 Electroforesis en gel de agarosa

Se preparó un gel de agarosa al 2% en una solución de tampón TBE (Tris 0,45 M, Borato 0,44 M, EDTA 0,01 M). El ADN amplificado se mezcló con tampón de carga verde (Green Go Taq® Flexibuffer Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante y 1 µL de SYBR® Green (Sigma-Aldrich®) 0,091% v/v, para alcanzar un volumen final de 11 µL. Se colocó el volumen total de la mezcla (11 µL) en el pocillo del gel y se corrió a 100 Voltios por aproximadamente 30 min dentro de la cámara de electroforesis (Mini-Sub® cell GT cell, Bio-Rad). Como marcador de pesos moleculares se utilizó 1 µL de ADN 50pb Step Ladder (Axygen) previamente mezclado con 3 µL de tampón de verde (Green Go Taq® Flexibuffer Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante y 1 µL de SyBR®green (Sigma-Aldrich®) 0,091% v/v. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz ultra violeta (Molecular Imager® Gel Doc™ XR System).

7.8 Hibridación en membrana de nylon

Este ensayo se realizó para todas las muestras positivas para infección por VPH con el fin de determinar aquellas que fueran de alto riesgo (criterio de

inclusión principal). Se desnaturalizaron los productos de amplificación de la PCR de VPH (~15 µL) en 110 µL de agua libre de nucleasas durante 5 min a 95 ° C en un termociclador. Luego se enfrió con hielo la solución de ADN desnaturalizado a 4 °C y se le añadió 110 µL de tampón 8X SSPE; 0,4% de SDS previamente calentada a 50 °C. Durante la desnaturalización del ADN, se montó el miniblottter con la membrana previamente preparada con las sondas de los diferentes genotipos de VPH en cada uno de sus canales y se llenaron éstos con tampón 2X SSPE, SDS al 0,1%. Luego se aspiró el exceso de líquido desde el segundo canal más a la izquierda, se aplicó el control de VPH16 y se añadió tampón 2X SSPE, SDS al 0,1% para llenar el canal y se repitió el procedimiento para todas las muestras siguiendo el orden de izquierda a derecha. Después se incubó el miniblottter con la membrana en una estufa durante una hora y media a 50 °C. Una vez finalizado el tiempo de incubación se retiró el exceso de líquido de los canales de la membrana, se desmontó la membrana e inmediatamente se realizaron 2 lavados con 250 mL de tampón 2X SSPE; 0,5% SDS precalentado a 50 °C en un recipiente de vidrio durante 10 minutos (cada lavado) y se dejó enfriar con hielo hasta alcanzar los 42 °C.

Inmediatamente después de los lavados, se colocó la membrana en una bolsa de sellado con solución de estreptavidina-peroxidasa diluido en 20 mL de tampón 2X SSPE; SDS al 0,5% (siguiendo las indicaciones del fabricante). Luego se selló la bolsa (evitando la formación de burbujas) y se incubó bajo el agua en un recipiente de vidrio a 42 °C durante 45 minutos con agitación suave. Después se lavó la membrana dos veces con 250 mL de tampón 2X SSPE, 0,5% SDS en un recipiente de vidrio con agitación suave a 42 °C durante 10 min (cada lavado). Finalizados los lavados la membrana se lavó nuevamente dos veces durante 5 minutos (cada lavado) con 250 mL de tampón 2X SSPE a temperatura ambiente en un recipiente de vidrio con agitación suave y se secó el exceso de líquido hasta dejar la membrana húmeda (sin permitir que se secase). Luego se prepararon 5 ml de solución de detección de ECL® (según las instrucciones del fabricante) en

una transparencia de A5 (esto es el volumen recomendado para el kit de detección ECL® ácido nucleico) y se dejó incubando la membrana boca abajo durante dos minutos a temperatura ambiente. Después se secó el exceso de líquido nuevamente dejando la membrana húmeda, se colocó la membrana entre dos láminas de transparencia A5 en un cuarto oscuro bajo luz roja, se añadió una película de auto radiografía en la parte superior del conjunto en un casete de exposición y se dejó en exposición durante 12 horas.

Una vez finalizadas las 12 horas se reveló la película de auto radiografía y se identificaron los genotipos visualizados mediante el uso de una matriz con patrones de los genotipos de 34 tipos diferentes de VPH.

7.9 PCR para la amplificación del ADN de *Chlamydia trachomatis* y *Ureaplasma urealyticum* en muestras de VPH positivo y negativo

Estos ensayos se prepararon para aquellas muestras que cumplieron con la primera parte del criterio de inclusión principal (sin infección por VPH y con infección por VPH de alto riesgo) y cumplir con la segunda parte del criterio de inclusión principal (sin infecciones por otros patógenos). Se preparó una solución de reacción similar a la preparada en la sección 7.6 (volumen final de 22,5 µL), con la única diferencia de que se utilizaron los cebadores KL1 (5'-TCCGGAGCGAGTACGAAGA-3') y KL2 (AATCAATGCCCGGGATTGGT-3') 0,356 pMol/µL (c/u) para la amplificación de *C. trachomatis* (Jenab et al., 2010). Mientras que para la amplificación de *U. urealyticum*, se utilizaron los cebadores UMA (5'-TTTGTTGTTGCGTTTTCTG-3') 0,28 µMol/µL y UMS 0,187 (5'-GTATTTGCAATCTTTATA TGTTCG -3') pMol/µL (Konget al., 2000). La solución se preparó en el volumen necesario para realizar la PCR por cada una de las muestras, junto con los respectivos controles negativo y positivo. Al igual que en la sección 7.6 las mezclas de reacción fueron llevadas a un volumen de 25 µL con las muestras de seleccionadas y el control positivo. Seguidamente se iniciaron

las reacciones de PCR con ciclos de desnaturalización a 94° C por 10 min; 40 ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación a 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 1min respectivamente para la de amplificación de *C. trachomatis* y 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C de 30 seg, hibridación a 52-58 °C por 30 seg y elongación a 72 °C por 1 min para la amplificación de *U. urealyticum*.

El éxito de la amplificación del material genético fue analizado a través de un gel de agarosa al 2% siguiendo el protocolo mencionado en la sección 7.7.

Las muestras que cumplieron con la primera parte del criterio de inclusión principal (positivas para infección por VPH de alto riesgo y negativas para infección por VPH) y fueron negativas para la amplificación de los patógenos de transmisión sexual *C. trachomatis* y *U. urealyticum* fueron seleccionadas para formar los pooles de muestras positivas y negativas para VPH.

7.10 PCR con el Kit STD 6 ACE Detección para la detección de patógenos de transmisión sexual

Para continuar con la segunda parte del criterio de inclusión principal (sin infecciones por patógenos de transmisión sexual) las muestras que fueron negativas para infecciones por las bacterias *C. trachomatis* y *U. urealyticum* fueron sometidas a una PCR con el Kit STD 6 ACE Detection Seegene Anyplex™ II. Se preparó una solución de reacción con los componentes del Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. La solución de reacción se preparó en un volumen necesario para realizar la PCR por cada una de las muestras seleccionadas, junto con un control interno (control negativo), un control positivo y un pool formado por 2 muestras positivas para *C. trachomatis* y *U. urealyticum*. Seguidamente, se inició la reacción de PCR con un ciclo de desnaturalización a 94° C por 15 min; de 2 a 40 ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación a 94 °C por 30 seg, 63 °C por 1 min y 30 seg y 72 °C por 1 min y 30 seg respectivamente.

El éxito de la amplificación del material genético fue analizado a través de un gel de agarosa al 2% siguiendo el protocolo mencionado en la sección 7.5, con la única diferencia que se utilizó el marcador de peso molecular proporcionado por el Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este ensayo permitió seleccionar el grupo de las 4 muestras que conformarían tanto el pool de muestras sanas como el pool de muestras infectadas.

7.11 Cuantificación de proteínas por método de Bradford

Para separar las proteínas, las muestras que cumplieron completamente el criterio de inclusión principal y fueron seleccionadas para formar los pools de muestras sanas e infectadas, suspendidas en acetona pura fueron centrifugadas a 20.160 g durante 15 minutos, luego se descartó la acetona y las muestras se dejaron secar en un concentrador al vacío durante 2 minutos para eliminar la acetona y solo dejar el precipitado de proteínas. Posteriormente las muestras fueron resuspendidas en 50-100 µL de tampón de rehidratación (urea 7 M, tiourea 2 M, triton X-114 al 4% v/v). Paralelamente, se realizó una curva de calibración (patrón) utilizando una solución de BSA 1 mg/mL en la placa de lectura. La curva se realizó en 6 de los pocillos (por duplicado) de la placa de lectura donde se preparó un volumen final de 5 µL (concentración final 1 µg/µL). Los 6 pocillos correspondieron a concentraciones que fueron desde 0 µg (blanco) hasta 5 µg/µL. Después se agregaron 250 µL de reactivo de Bradford y se dejó incubando 5 min.

Luego se realizó una dilución 1:5 de las muestras resuspendidas seleccionadas y de las alícuotas correspondientes a dichas muestras (1 µL de muestra en 4 µL de H₂O) y de esta diluciones se tomó 1µL y se llevaron a 5 µL con H₂O para introducirlos en la placa de lectura (doble dilución) (factor de dilución 5). Adicionalmente se agregaron 250 µL de reactivo de Bradford a las muestras

seleccionadas y a sus respectivas alícuotas y se midieron las absorbancias con un filtro de 595 nm en un espectrofotómetro para placas. Los valores de las absorbancias fueron proporcionados por el software de lectura Ascent™ de Thermo Scientific™. Con los valores de absorbancia obtenidos se calculó la concentración de las proteínas halladas en las muestras y sus respectivas alícuotas mediante el software de análisis Insat Graphic™.

Finalmente se armaron los pools de muestras sanas e infectadas para asegurar que se obtuviera una concentración de proteínas suficiente para realizar los ensayos necesarios de electroforesis en dos dimensiones para comparar el proteoma de las muestras sanas con las infectadas.

7.12 Isoelectroenfoque

Se tomó una alícuota de los pools de muestras sanas e infectadas resuspendidos en tampón de rehidratación (urea 7 M, tiourea 2 M, triton X-114 al 4% v/v) cuya concentración estuviera dentro del límite recomendado para la tira de isoelectroenfoque y se resuspendió en tampón de isoelectroenfoque (tampón IEF) (urea 7 M, tiourea 2 M, triton X-114 al 4% v/v, anfolitos 3-10 0,8% v/v, DTT 65 mM y azul de bromofenol 0,002% p/v) en un volumen final de 155 µL (este paso se realizó por cuadruplicado para cada pool). Al mismo tiempo, se prepararon las tiras y el casquete de isoelectroenfoque (Immobiline™ DryStip pH 3-10; 7 cm, GE Healthcare) en los que se corrieron las muestras durante la electroforesis. El volumen total de la mezcla tampón de isoelectroenfoque y muestra se depositaron en el canal del extremo negativo del casquete (evitando la formación de burbujas). El acetato protector fue retirado de la tira con la ayuda de una pinza, y sujetando la tira por el extremo negativo (menos básico) fue depositada en el mismo canal donde se depositó la muestra, hasta que el extremo positivo (más ácido) de la tira tocara el final del canal (este procedimiento se realizó para el resto de los canales que contenían la mezcla de tampón y muestra).

Se sellaron los canales negativos y positivos con la cinta de sellado Invitrogen (evitando la formación de burbujas) y se dejaron rehidratando en posición horizontal durante 12 horas. Una vez finalizada la rehidratación del gel, se retiraron las cintas de sellado y las cubiertas plásticas de los canales. En las zonas con adhesivo se colocó un pedazo de papel de filtro para hacer contacto con los electrodos y se agregaron 600 μ L de agua destilada sobre el papel de filtro para permitir el flujo de iones y mantener las tiras fijadas en el casquete. Se ensambló la cámara de electroforesis (ZOOM® IPGRunner™ Mini-Cell, invitrogen) y se llenó la cámara externa con 600 mL de agua destilada y se corrió la electroforesis a 175 voltios por 15 min bajo una corriente constante para dar inicio a la focalización (prefocalización), luego de 175 a 2000 voltios por 45 min bajo una corriente rampa para continuar la focalización, y finalmente 2000 voltios por 60 min a una corriente constante para permitir a las proteínas alcanzar su PI.

Una vez finalizada la primera dimensión se retiró el papel de filtro y se levantó el acetato con cuidado para extraer las tiras. Éstas fueron sometidas a un primer paso de equilibrado al sumergirse durante 15 minutos en 2mL de tampón de equilibrio (Urea 6M; Tris HCl 1,5M pH 8,8; Glicerol 30%, SDS 2% y azul de bromofenol 0,001%) más DTT 65mM (o 65 μ L de solución de DTT 1 M). Posteriormente, se retiró el tampón y la tira fue sometida a un segundo (y último) paso de equilibrado al sumergirse durante 15 minutos en 2mL de tampón de equilibrio (Urea 6M; Tris HCl 1,5M pH 8,8; Glicerol 30%, SDS 2% y azul de bromofenol 0,001%) más 0,074 g de iodoacetamida 200 mM.

Durante la primera dimensión se prepararon los geles de poliacrilamida de la segunda dimensión para tenerlo listo al final de la fase de equilibrio. Se dispusieron los separadores entre los vidrios de electroforesis, los cuales después se montaron sobre los soportes y se armaron dentro de la cámara de electroforesis (PROTEAN® II xi Cell Protean II xi 2D Cell, Bio-Rad). Se llenó el espacio entre los vidrios con el gel de sellado (Acrilamida 50%, TEMED 100%,

APS 10% y el volumen necesario de H₂O nano pure necesario para alcanzar 2 mL). Una vez polimerizado el gel de sellado se preparó el gel de corrida al 11% (Acrilamida 50%, Tris-HCl 0,935 M pH 8,8, SDS 10%, APS 10%, TEMED 100% y el volumen de H₂O nano pure necesario para alcanzar 20 mL) y se agregó entre los vidrios de electroforesis. Una vez polimerizado el gel de corrida se preparó el gel de apilamiento al 5% (Acrilamida 50%, Tris-HCl 0,313 M pH 6,8, SDS 10%, APS 10%, TEMED 100% y el volumen de H₂O nano pure necesario para alcanzar 5 mL). Se preparó un gel por cada dos tiras de isoelectroenfoco.

Después de polimerizar el gel de apilamiento se posicionaron 2 tiras usadas en la primera dimensión, correspondientes a las condiciones a estudiar (muestras sanas e infectadas) sobre cada gel de acrilamida. Las tiras se ubicaron a lo largo del gel (sobre el gel de apilamiento) manteniendo la orientación del extremo positivo a la izquierda y el extremo negativo hacia la derecha en cada tira. Adicionalmente se colocó un pedazo de papel de filtro humedecido con un marcador de peso molecular conocido en el espacio entre cada tira de electroforesis. Se selló con gel de agarosa 0,5% con azul de bromofenol 0,002% y se dejó reposar. Por último se llenó la cámara de electroforesis con tampón de corrida Tris-Glicina-SDS 1X (Tris base 0,025 M Glicina 0,192 M, SDS 1%, H₂O destilada) y se corrió la electroforesis del gel formado con 45 mA por 1 hora y 45 minutos.

Una vez finalizada la electroforesis en 2 dimensiones se procedió a teñir los geles para su posterior revelado.

7.13 Tinción con Azul de Comassie

Se sacaron los geles de la cámara de electroforesis y se dejaron en agitación durante una hora en solución de fijación (etanol 30% v/v, ácido acético 10% v/v). Al finalizar la fijación se retiró la solución de fijado y se guardó para ser reutilizada,

posteriormente se añadió solución colorante azul de comassie (azul brillante R 0,2 % p/v, etanol 50% v/v y ácido acético 10% v/v) y se dejó en agitación durante una hora. Para finalizar se retiró la solución colorante y se guardó para ser reutilizada y se añadieron a los geles solución decolorante (etanol 50% v/v y ácido acético 10% v/v) y se dejaron en agitación durante una hora con cambios de solución cada 20 minutos, hasta eliminar el exceso de colorante dejando visible solo las bandas.

Una vez finalizada la tinción se tomaron fotografías de cada uno de los geles en un transiluminador de luz UV.

8.- RESULTADOS

8.1 Comparación entre 2 métodos de toma de muestra de cuello uterino

Se determinó la concentración de ADN en 95 muestras de las 100 obtenidas por ambos métodos. Las Tablas 1 y 2 reportan los valores de concentraciones de ADN determinados en las muestras. Para hacer más fácil su análisis, las muestras se agruparon en grupos de diferentes intervalos de concentración de ADN. La Tabla 1 recoge los valores para las muestras obtenidas por el método de lavado vaginal, mientras que la Tabla 2 las de hisopado respectivamente. Se puede observar como en ambas Tablas cada intervalo concentración de ADN corresponde con un intervalo una muestra, por ejemplo: en la Tabla 1 en el primer intervalo posee las concentraciones de 16 y 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, que corresponden a las muestras 64 y 88. Lo propio se realizó para el resto de los intervalos.

Intervalo de concentración de ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Número de muestras por intervalo (%)
16 - 80	17 (17,9)
114 - 170	21 (22,1)
170 – 495	25 (26,3)
524 - 779	14 (14,7)
800 – 1420	18 (18,9)

Tabla 1: Determinación de la concentración de ADN en muestras de lavado vaginal.

Intervalo de concentración de ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Número de muestras por intervalo (%)
0 – 100	58 (61)
100 – 200	17 (17,9)
200 – 479	15 (15,8)
620 – 1190	5 (5,2)

Tabla 2: Determinación de la concentración de ADN en muestras de hisopado vaginal.

Adicionalmente, se puede observar al comparar ambas Tablas que los valores de intervalos de concentraciones de ADN son mayores en las muestras obtenidas por lavado que por hisopado y que 61 % de las muestras obtenidas por hisopado poseen concentraciones de ADN por debajo de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Se aplicó la prueba estadística Wilcoxon-Mann-Whitney a las mismas 95 muestras para determinar si existían diferencias significativas en cuanto a la concentración de ADN de las muestras obtenidas por lavado en comparación con las de hisopado. Para realizar la prueba estadística las muestras de lavado e hisopado fueron separadas en categorías de estudio denominadas “X” (Tabla 3) y “Y” (Tabla 4) respectivamente. Los datos fueron organizados de mayor a menor

para ambas categorías y luego se les asignaron rangos desde el menor valor hasta el mayor, incluyendo los empates (Siegel y Castellan, 1998).

Concentraciones ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Rangos de X (desde-hasta)
16 - 130,5	13,5 - 87
140 – 265	90 - 125
306 - 743,5	131 - 164
774 – 1418	166 - 187

Tabla 3: Rangos e intervalos de concentración de ADN para las muestras obtenidas por lavado.

Concentraciones ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Rangos de Y (desde-hasta)
0 – 30	2 - 25,5
31- 67,5	27 - 57
70 – 194	58 - 112
212,5 – 1188	115 -178

Tabla 4: Rangos e intervalos de concentración de ADN para las muestras obtenidas por hisopado.

Las Tablas 3 y 4 muestran los valores de concentraciones de ADN ordenados de menor a mayor en intervalos a los cuales se les asignaron rangos desde el menor valor hasta el mayor y las muestras a las cuales correspondían los valores de concentración de ADN en ése rango, por ejemplo: En la Tabla la menor concentración es de 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (que corresponde a la muestra 64 recolectada por el método de hisopado), a la cual se le asignó el menor rango que fue 2, el proceso siguió la misma dinámica para todas las muestras obtenidas por ambos métodos.

Para esta prueba se contabilizaron un total de 95 mediciones (95 muestras) para ambos métodos y se realizó una sumatoria de los rangos obtenidos. Los

rangos de “X” correspondieron a los rangos del método de hisopado con un total de 11431; mientras que los rangos de “Y” correspondieron a los rangos del método de lavado clásico con un total de 6323. Se propusieron las siguientes hipótesis con un α de 0,05:

- **H₀**: Ambos métodos recolectan la misma cantidad de ADN (son iguales).
- **H₁**: El método de lavado recolecta mayor cantidad de ADN que el hisopado clásico (son diferentes).

Posteriormente, se calculó el estadístico Z para determinar su probabilidad asociada y realizar el contraste de hipótesis mediante la fórmula:

$$z = \frac{W_x \pm 0.5 - \mu_{w_x}}{\sigma_{w_x}}$$

Figura 1: Fórmula para el cálculo del estadístico Z (Donde W_x es la sumatoria de los rangos de X, μ_{w_x} es la media y σ_{w_x} es la desviación estándar calculados previamente con sus respectivas fórmulas (Siegel y Castellan, 1998).

El valor del estadístico Z calculado fue igual a 2,54 y cuando se buscó su probabilidad (p) asociada, ésta resultó ser de 0,0055 (Siegel y Castellan, 1998).

Luego de analizar a través de los ensayos de PCR de VPH los resultados de las 95 muestras recolectadas por ambos métodos, se construyeron las Tablas 5 y 6 para las frecuencias observadas y esperadas de los resultados de dichos ensayos. Para facilitar el análisis de las Tablas 5 y 6, los resultados fueron presentados con los símbolos “+ y +” para indicar positivo para lavado e hisopado, “+ y -” para indicar positivo para lavado negativo para hisopado, “- y +” para

indicar negativo para lavado positivo para hisopado y por último “- y -” para indicar negativo para lavado e hisopado.

		Hisopado		Total
		+	-	
Lavado	+	14	8	22
	-	4	69	73
Total		18	77	95

Tabla 5: Frecuencias observadas para los resultados de PCR de VPH de las muestras de lavado e hisopado.

		Hisopado		Total
		+	-	
Lavado	+	4,17	17,8	22
	-	13,83	59,1	73
Total		18	77	95

Tabla 6: Frecuencias esperadas para los resultados de PCR de VPH de las muestras de lavado e hisopado.

Para esta prueba, los 95 datos correspondientes a cada categoría (toma de muestra) fueron comparados entre sí y su interacción con las variables (el resultado del ensayo de PCR). Se propusieron las siguientes hipótesis con un α de 0,05:

- **H₀:** No hay diferencias (ambos métodos obtienen los mismos resultados en los ensayos de PCR)
- **H₁:** Hay diferencia (el método de lavado obtiene mejores resultados en los ensayos de PCR).

Posteriormente, se calculó el estadístico Ji-cuadrado, con la fórmula presentada en la Figura 2.

$$X^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \frac{(n_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

Figura 2: Fórmula para el cálculo del estadístico Ji-cuadrado (donde n representa las frecuencias observadas y E representa las frecuencias esperadas; donde r son las clasificaciones (filas) y c los grupos (columnas) (Siegel y Castellan, 1998).

El valor del estadístico Ji-cuadrado (X^2) calculado fue de 37,23 considerando los grados de libertad (igual a 1) proporcionados por la fórmula de la figura 3.

$$gl = (r - 1)(c - 1)$$

donde

r = el número de clasificaciones (renglones), y
 c = el número de grupos (columnas)

Figura 3: Fórmula para el cálculo de grados de libertad para la prueba de Ji-cuadrado.

Posteriormente con el valor del estadístico, se calculó la distribución Ji-cuadrada que fue igual a 1, con una probabilidad asociada de 1,04914E-09 (cálculos no mostrados).

8.2 Precipitación con acetona

Se realizó una determinación de absorbancia a 280 nm, a pesar de que no es un parámetro ideal para determinación de concentración de proteínas, permitió determinar de forma relativa cual método proporcionaba mayor cantidad de proteínas, ya que esto facilita las electroforesis de comparación de proteomas. Se escogieron las muestras de lavado debido que con éste método se obtuvo en promedio 4 veces mayor cantidad de proteínas con respecto al hisopado.

Adicionalmente, se construyó la Tabla 7 con los valores de absorbancia 280 nm (la cual una vez más fue utilizada como parámetro para realizar un seguimiento de la acetona como agente precipitador de las proteínas del FCV).

Absorbancia a 280 nm (Desde – hasta)	Concentración inicial en µg/µL
0 - 0,043	0 - 0,48
0,045 - 0,102	0,5 - 1,13
0,104 - 0,241	1,15 - 2,68
0,244 - 1,174	2,71 - 19,39

Tabla 7: Absorbancia y concentración inicial de proteínas (Los valores de concentración final no aparecen por ser todos igual a cero).

La Tabla 7 se construyó con solo 80 de las 100 muestras recolectadas en durante a tesis porque hasta la muestra 80 fue que se seleccionaron las muestras que constituyeron los pooles de muestras sanas e infectadas y no se le realizó extracción de proteínas a las muestras que siguieron.

Las muestras están organizadas en intervalos que van desde los valores de absorbancia y concentración más bajos hasta los más altos a los cuales están asociadas las muestras. Por ejemplo en el primer intervalo de concentración inicial de proteínas están los valores de 0 hasta 0,48 µg/µL, los cuales corresponden las muestras 17 y 38, respectivamente.

La concentración de proteínas suspendidas en el sobrenadante (luego de precipitar o concentración final) fue igual al 0 µg/µL, por lo que no aparecen en la Tabla.

8.3 Amplificación del ADN de VPH en las muestras y electroforesis en gel de agarosa al 2 %

El resultado de la amplificación del ADN de VPH se observa en la Figura 4 solo para las primeras 5 muestras recolectadas en el proyecto (éstas muestras fueron recolectadas únicamente por el método de lavado). El resto de las muestras presentaron resultados similares. El ovalo azul encierra a las muestras que muestran una amplificación exitosa (incluyendo al control positivo) indicando presencia de infección con el virus del papiloma humano (1; 3 y 4). Las muestras sin ovalo azul no presentaron amplificación indicando que son negativas para VPH. Debajo cada óvalo azul, los óvalos rojos encierran la banda de HLA (antígeno de leucocito humano en español) que es una secuencia que amplifica con los cebadores HLADQ (que se sirvieron durante la mezcla de reacción de PCR) y sirve como control de la amplificación. Se obtuvieron en total 21 muestras positivas para infecciones por VPH y 79 negativas (las 100 muestras utilizadas en este ensayo), éstas muestras fueron sometidas a los ensayos de amplificación de *C. trachomatis* y *U. urealyticum*, hasta encontrar aquellas que se ajustaran a la segunda parte del criterio de inclusión (carecer de infecciones por otros patógenos de transmisión sexual).

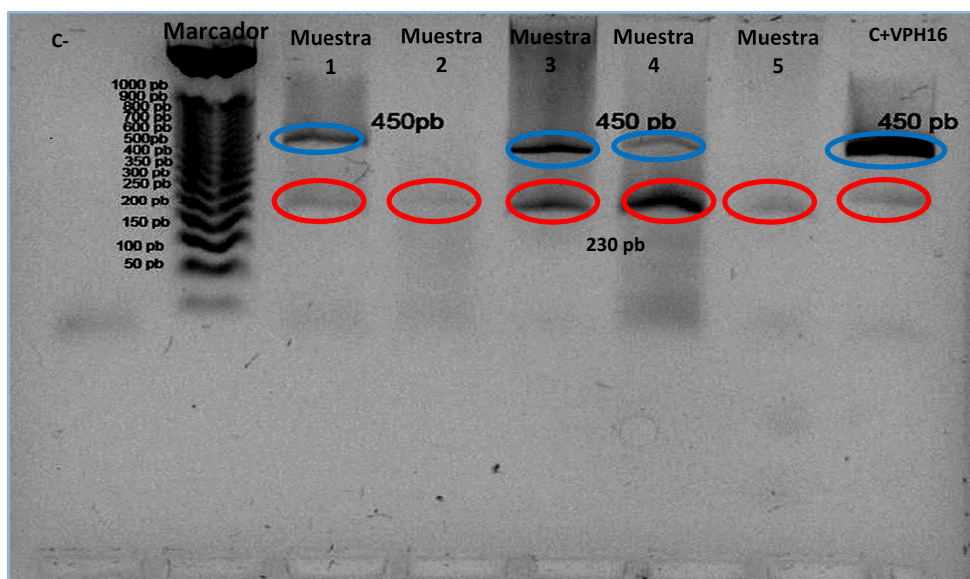


Figura 4: Determinación de VPH por PCR (Los bolsillos del gel están organizados de izquierda a derecha como; control negativo, el marcador de tamaño molecular, las muestras número 1; 2; 3; 4; 5 y el control positivo VPH16)

8.4 Hibridación en membrana de nylon

Posteriormente a los ensayos de amplificación de VPH, con los resultados obtenidos en la hibridación en membrana de nylon se construyó la Tabla 8, con todas las muestras positivas para VPH (un total de 22 muestras que fueron recolectadas por los métodos de lavado e hisopado vaginal y 3 muestras que solo fueron tomadas por el método de lavado) y sus respectivos genotipos (de alto, bajo riesgo y riesgo indeterminado). Las fotografías de los ensayos de hibridación en membrana no serán mostradas en los resultados.

Número de muestra	Genotipo	Número de muestra	Genotipo
1	Alto riesgo 51	47	Alto riesgo 16
3	Alto riesgo 16	51	Alto riesgo 45
4	Alto riesgo 45 y 59 con bajo riesgo 53	56	Bajo riesgo 44
9	Alto riesgo 68 y 73 con riesgo indeterminado 26 y 57	60	Bajo riesgo 43 con alto riesgo 58
15	Alto riesgo 26 y 57	62	Riesgo indeterminado 57
17	Alto riesgo 16	71	Alto riesgo 45 y 59 con bajo riesgo 40 y con riesgo indeterminado 30
24	Alto riesgo 45 con bajo riesgo 11	74	Alto riesgo 52 y 31
29	Alto riesgo 59	89	Bajo riesgo 11
32	Alto riesgo 52	91	Alto riesgo 59 y 16
36	Alto riesgo 66	95	Alto riesgo 16 con riesgo indeterminado 30
37	Alto riesgo 53	98	No identificado
40	Riesgo indeterminado 83	100	Riesgo indeterminado 30
46	No identificado		

Tabla 8: Muestras positivas para VPH con sus genotipos.

8.5 PCR para la amplificación del ADN de *Chlamydia trachomatis* y *Ureaplasma urealyticum* en muestras de VPH positivo, negativo

El resultado de la amplificación del ADN de *C. trachomatis* se observa en la Figura 5, en la cual solo se visualizan un grupo de muestras positivas y negativas para VPH y los controles positivo y negativo. Este ensayo fue aplicado a las 100 muestras hasta conseguir aquellas que coincidieran con la segunda parte del criterio de inclusión principal (sin infecciones por otros patógenos de transmisión sexual). Las muestras 28; 30 y 31 correspondían al grupo de muestras de negativas para VPH; mientras que las muestras 29 y 32 correspondían a las muestras positivas para VPH de alto riesgo. El ovalo anaranjado encierra a las muestras que presentaron amplificación exitosa (incluyendo al control positivo) indicando que son positivas para *C.tracomatis* (28 y 29). Las muestras sin ovalo anaranjado no presentaron amplificación indicando ausencia de infección con la bacteria.

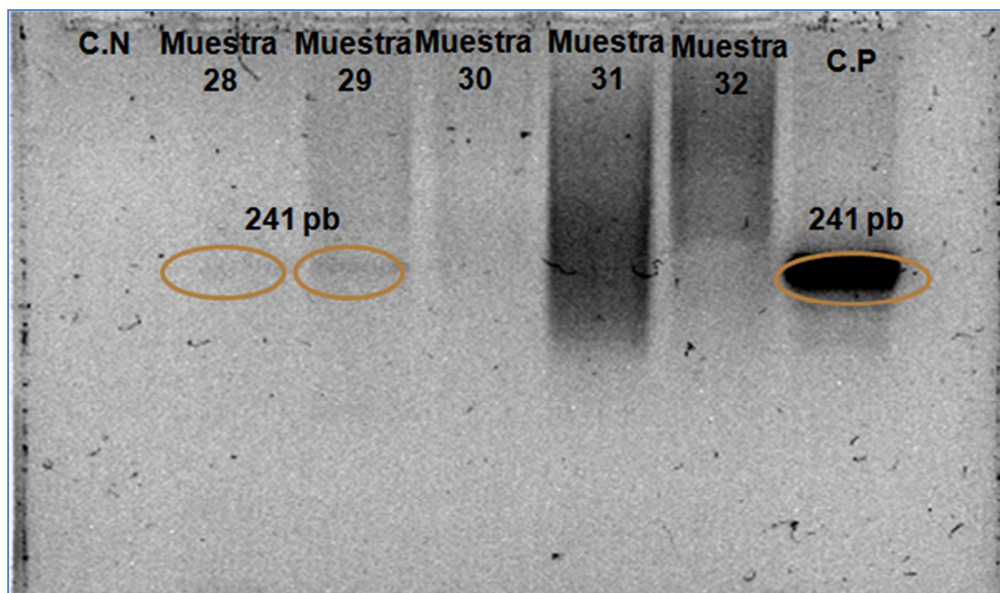


Figura 5: Gel de agarosa 2% del producto de la PCR de *Chlamydia* (Los bolsillos del gel están organizados de izquierda a derecha como; control negativo, muestras 28; 29; 30; 31 y 32 y el control positivo respectivamente).

Los resultados obtenidos para el resto de las muestras fueron similares a los presentados en la Figura 5. Adicionalmente, todas muestras negativas para *C. trachomatis* que resultaron positivas para VPH de alto riesgo así como las negativas fueron seleccionadas para los ensayos de amplificación de *U. urealyticum*.

El resultado de la amplificación del ADN de *U. urealyticum* se observa en la Figura 6 para un grupo de muestras positivas para VPH de alto riesgo, a las cuales se les desea determinar si cumplen con la segunda parte del criterio de inclusión principal. El ovalo azul encierra solo al control positivo que presentó una amplificación exitosa. El resto de las muestras no presentaron amplificación indicando ausencia de infección con *Ureaplasma urealyticum*. Aunque no se muestra Figura con el resultado del gel, la amplificación para los grupos de muestras negativas para VPH presentaron resultados similares (sin amplificación para *U. urealyticum*).

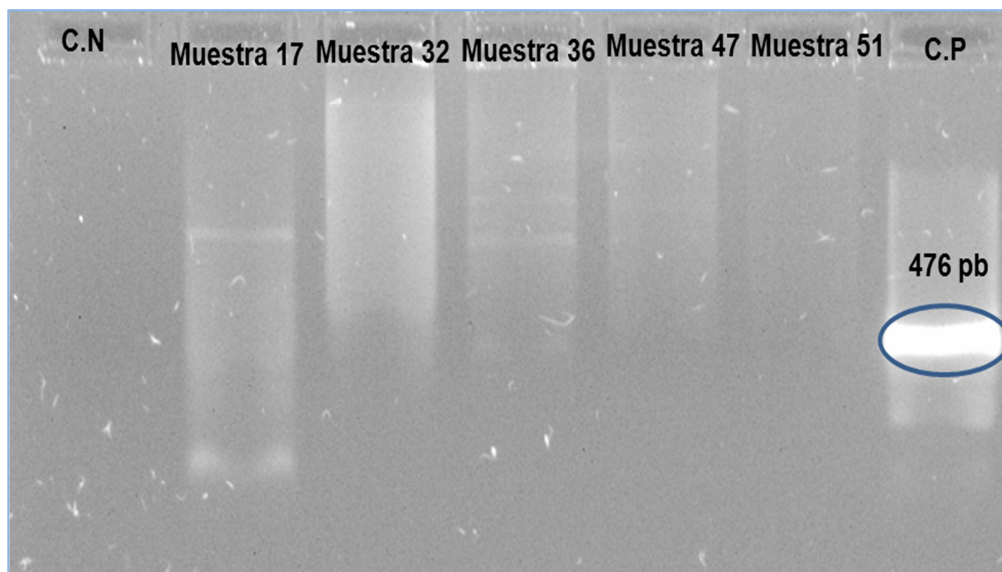


Figura 6: Gel de agarosa 2% del producto de la PCR de Ureaplasma (Los bolsillos del gel están organizados de izquierda a derecha como; el control negativo, las muestras 17; 32; 36; 47; 51 y el control positivo).

Para el estudio en cuestión fueron seleccionadas las muestras que cumplieron con la primera parte del criterio de inclusión principal. Las muestras 1; 3; 17 y 32 fueron seleccionadas como el “pool Σ ” (Sigma) al cumplir el criterio de VPH $^+$, Chlamydia $^-$ y Ureaplasma $^-$. Las muestras 6; 7; 13 y 14 fueron seleccionadas como el “pool X” (Equis) al cumplir el criterio de VPH $^-$, Chlamydia $^-$ y Ureaplasma $^-$.

8.6 PCR con el Kit STD 6 ACE Detection para la detección de patógenos de transmisión sexual y electroforesis en gel de agarosa 2%

El resultado de la amplificación del Kit STD 6 ACE detection se observa en la Figura 7, para las muestras sanas (sin infecciones de VPH). Encerrada en un ovalo azul se observa una banda que corresponden al control interno de amplificación que posee el Kit. Dicha banda aparece en todas las muestras lo cual indica una amplificación exitosa (el control negativo carecía de control interno por

eso no se observa amplificación). El marcador de peso molecular no se observó en ambas fotografías.

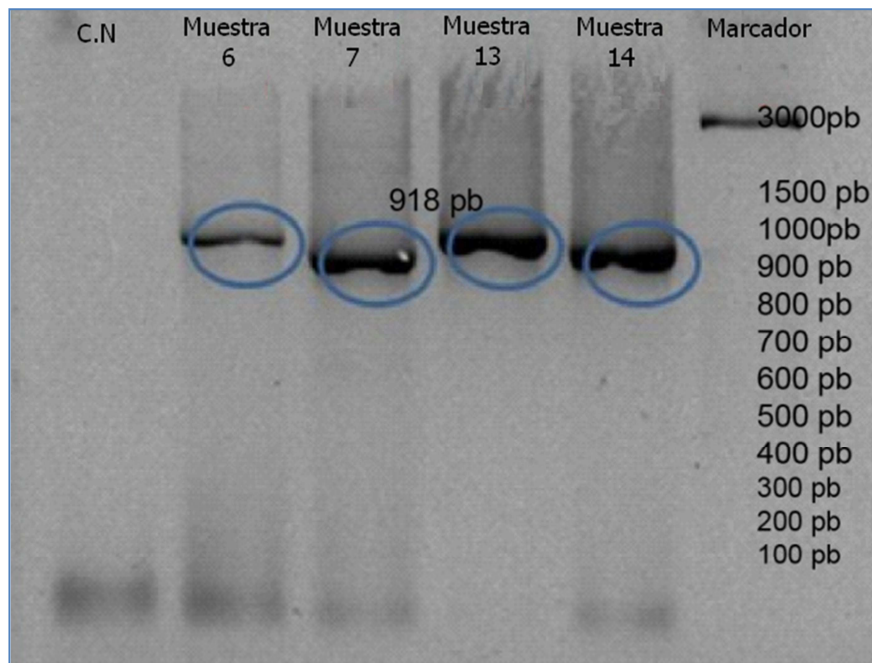


Figura 7: Gel de agarosa al 2% del producto de la PCR del kit STD 6 ACE detection para las muestras sanas (Los bolsillos del gel están organizados de izquierda a derecha como; el control negativo, las muestras número 6; 7; 13 y 14 y el marcador de peso molecular)

El resultado de la amplificación del Kit STD 6 ACE detection se visualizan en la Figura 8, para las muestras con infecciones positivas para VPH. Encerrada en un ovalo azul se observa una banda que corresponden al control interno del Kit, dicha banda aparece en todas las muestras indicando una amplificación exitosa. El pool de muestras positiva posee un ovalo rojo que indica amplificación que corresponde con *U. urealyticum*. El control positivo posee 4 bandas encerradas en un ovalo rojo que indican la amplificación que corresponden con *T. vaginalis*, *M. hominis*, *M. genitalium*, *C. trachomatis*. Las bandas para *N. gonorrhoeae*, y *U. urealyticum* no se observaron.

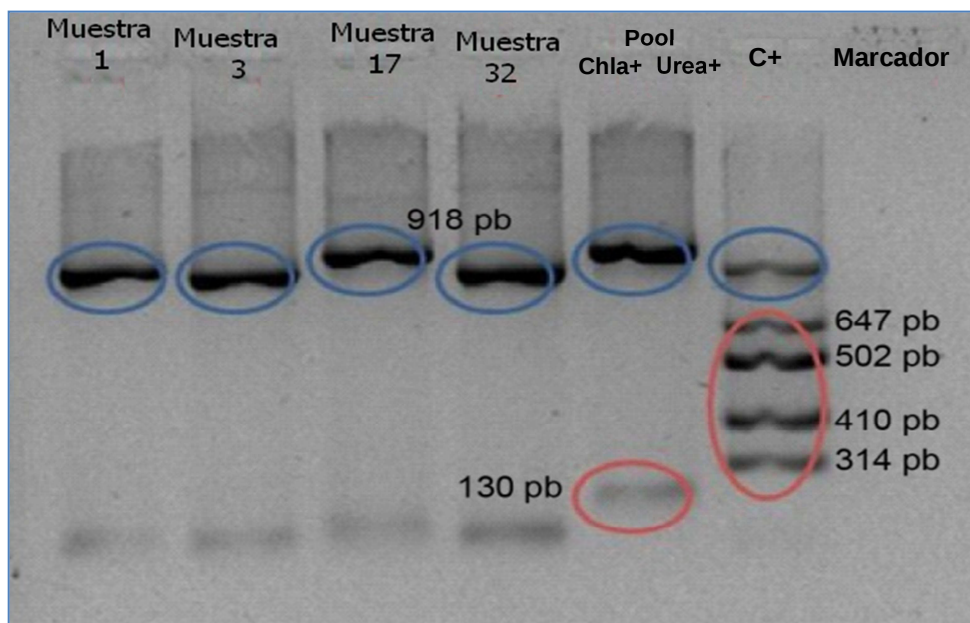


Figura 8: Gel de agarosa del producto de la PCR del kit STD 6 ACE detection para las muestras infectadas (Los bolsillos del gel en la Figura 8 están organizados de izquierda a derecha como; las muestras número 1; 3; 17; 32; el pool de muestras positivas para *C. trachomatis* y *U. urealyticum*, el control positivo del Kit y el marcador de peso molecular).

8.7 Cuantificación de proteínas por método de Bradford y rendimiento de extracción

Con los valores de concentración de proteínas antes y después de precipitar se construyeron las Tablas 9 y 10 para las muestras infectadas y sanas (que reunieron los criterios de inclusión), respectivamente. La concentración de proteínas final (después de precipitar) es mayor para todas las muestras infectadas y en 2 de las muestras sanas (muestras 7 y 13). En las dos muestras sanas restantes (muestras 6 y 14) la concentración de proteínas final resultó ser menor que la inicial con 6,44 y 4,13 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectivamente.

Muestras Infectadas		
Número de muestra	Concentración antes de precipitar ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Concentración después de precipitar ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
1	3,25	4,12
3	1,45	6,57
17	0,59	7,38
32	0,28	7,82

Tabla 9: Concentración de proteínas antes y después de precipitar, en muestras infectadas

Muestras Sanas		
Número de muestra	Concentración antes de precipitar ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Concentración después de precipitar ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
6	7,5	6,44
7	0,6	5,65
13	6,73	21,25
14	4,51	4,13

Tabla 10: Concentración de proteínas antes y después de precipitar, en muestras sanas

Con los valores de proteínas totales antes y después de precipitar se determinó el porcentaje de rendimiento y se construyeron las Tablas 11 y 12 para las muestras infectadas y sanas, respectivamente. Los porcentajes de rendimiento varían en ambas Tablas siendo las muestras 1 y 32 los valores más bajo y alto para las muestras infectadas (con 3,16 y 55,66%, respectivamente), mientras que las muestras 6 y 7 son los valores más bajo y alto para las muestras sanas (con 2,15 y 23,54 %, respectivamente).

Muestras Infectadas			
Muestra	Proteínas totales antes de precipitar (µg)	Proteínas totales después de precipitar (µg)	% de rendimiento
1	6510	206	3,16%
3	2900	328,7	16,46%
17	1198	369	30,80%
32	702,5	391	55,66%

Tabla 11: Cantidad de proteínas totales y porcentaje de rendimiento para las muestras infectadas.

Muestras Sanas			
Muestra	Proteínas totales antes de precipitar (µg)	Proteínas totales después de precipitar (µg)	% de rendimiento
6	15000	321,8	2,15%
7	1200	282,5	23,54%
13	13470	1062,75	7,89%
14	9020	282,5	2,29%

Tabla 12: Cantidad de proteínas totales y porcentaje de rendimiento para las muestras sanas

8.8 Isoelectroenfoque y tinción

En la Figura 9 se puede observar el gel de isoelectroenfoque en 2 dimensiones teñido con el colorante azul de Comassie. Encerrados en círculos negros y enumerados se pueden observar los puntos que corresponden a las proteínas separadas en la electroforesis. En el extremo izquierdo para el pool "X" se pueden observar 2 ovalos, el primero corresponde a una sucesión de puntos de gradiente de pH básico cuyo peso molecular se encuentra entre 66.000 y 45.000 dalton; mientras que en segundo ovalo corresponde a otra sucesión de puntos de

gradiente de pH empieza siendo un poco ácido y se va volviendo más básico cuyo peso molecular se encuentra por debajo de los 24.000 dalton. En el extremo derecho para el pool “Σ” se pueden observar 4 ovalos, el primero corresponde a una sucesión de puntos de gradiente de pH básico y cuyo peso molecular está por encima del marcador; el segundo ovalo corresponde a una sucesión de puntos de gradiente de pH un poco ácido y cuyo peso molecular está por encima del marcador; el tercer ovalo corresponde a varios puntos que poseen diferentes gradientes de pH que están entre ácido-básico y diferentes pesos moleculares entre los 45.000 y 39.000 dalton; por último el cuarto ovalo encierra un punto de gradiente de pH muy básico cuyo peso molecular está entre los 45.000 y 39.000 dalton.

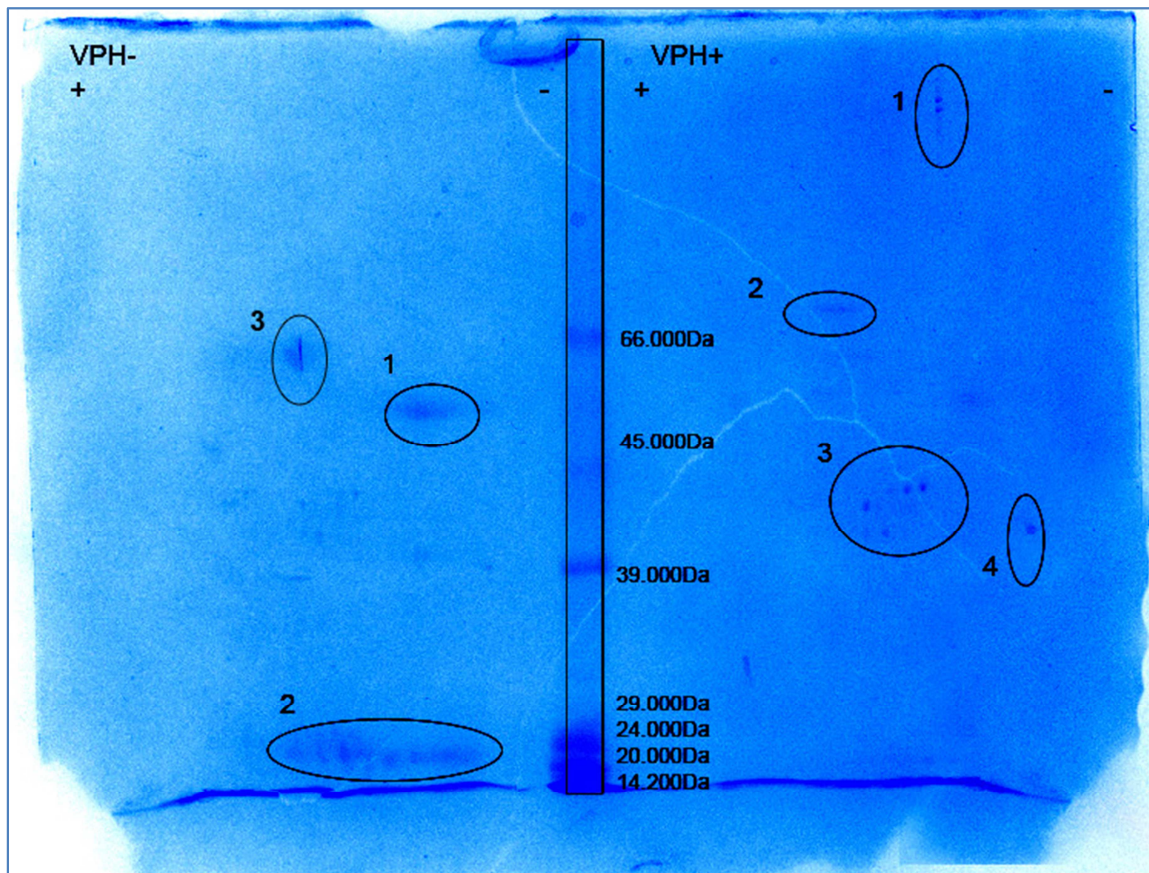


Figura 9: Gel de IEF en 2 dimensiones de los patrones de muestras de VPH – en comparación con patrones de muestras de VPH + (En el extremo izquierdo del gel corresponde a la posición de la tira de isoelectroenfoque que poseía el pool de muestras negativas para VPH (pool X), mientras que en el extremo derecho corresponde a la posición de la tira de isoelectroenfoque que poseía el pool de muestras positivas para VPH (pool Σ). Cada uno de los extremos del gel que corresponde a las tiras tienen señalados los símbolos positivo y negativo (“+” y “-”) indicando el gradiente de pH que posee la tira; de izquierda a derecha va desde el extremo más ácido al menos ácido o más básico. Entre ambas tiras de IEF se encuentra encerrado en un recuadro negro el marcador de tamaño molecular Dalton Mark® VII-L con sus respectivos valores.

9-. DISCUSIÓN

En la prueba de Wilcoxon-Mann Whitney para determinar si existen diferencias entre la cantidad de ADN recolectada por los métodos de lavado y hisopado vaginal o si esta es la misma, al compararse la probabilidad asociada (p) obtenida por el estadístico (0,0055) con el valor crítico ($\alpha=0,05$) el valor de p fue mucho menor, indicando que la probabilidad asociada a que el método de lavado recolecte la misma cantidad de ADN que el hisopado tradicional es significativamente baja. Por consiguiente se rechaza la hipótesis nula y se determina que el método de lavado proporciona una mayor fuente de ADN que el hisopado tradicional. Estos resultados sugieren que debido al lavado adicional durante la toma de muestra permite mayor recolección de FCV de la superficie de las células del endocervix además de facilitar de alguna forma el desprendimiento dichas células donde está el virus (u otros agentes infecciosos) completando su desarrollo.

Adicionalmente en la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney para determinar entre los 2 métodos cual permitía obtener un ADN con mayor calidad basándose en los datos de la relación de absorbancia 260/280 nm, se determinó el estadístico Z y la p asociada con los datos presentados en la Tabla 13.

Intervalos de relación 260/280 nm para las muestras de lavado	Intervalos de relación 260/280 nm para las muestras de hisopado
1,001 – 1,373	0 – 1,4
1,382 – 1,502	1,402 – 1,492
1,503 – 1,598	1,500 – 1,567
1,598 – 1,718	1,575 – 1,678
1,721 – 2,133	1,690 - 7

Tabla 13: Intervalos de relación 260/280 nm para muestras de lavado e hisopado.

El Z estadístico fue de 2,08 con un p asociada de 0,0188 (Siegel y Castellan, 1998). Al compararse con el valor crítico ($\alpha=0,05$) el valor de p fue mucho menor, indicando que la probabilidad de que ambos métodos recolectaran el ADN con la misma calidad de pureza es significativamente baja. Por consiguiente se rechazó la hipótesis nula (ambos métodos recolectan una cantidad de ADN igualmente pura) determinando, que el método de lavado proporciona un ADN más puro posiblemente debido a que con mayor cantidad de ADN durante la extracción, el fenol y el cloroformo logran minimizar la interferencia de agentes contaminantes (restos de lípidos de la membrana celular y otras proteínas) (Amaru *et al.*, 2008; Jiménez 2009).

Para lograr determinar cual método puede ofrecer resultados más precisos en ensayos de PCR de VPH con la prueba de Ji-cuadrado, al compararse con el valor crítico ($\alpha=0,05$) el valor de p ($1,04914E-09$), éste último fue mucho menor, indicando que la probabilidad los resultados obtenidos en ensayos de PCR por ambos métodos sean iguales es significativamente baja. Por consiguiente se rechaza la hipótesis nula, indicando, con una probabilidad bastante significativa que el lavado vaginal permite realizar diagnósticos moleculares más precisos y disminuir los falsos negativos que el hisopado vaginal, debido a que con una mayor fuente de material genético el cual posee un alto grado de pureza facilita la amplificación de secuencias de interés en ensayos de PCR.

Debido a la evidencia proporcionada en cuanto a cantidad y calidad de ADN como cantidad de proteínas, las muestras pertenecientes al método de lavado fueron seleccionadas para los ensayos de detección de VPH, *C. trachomatis*, *U. urealyticum* y además los microorganismos *T. vaginalis*, *M. hominis* y *M. genitalium* (Kit) para asegurar que las muestras utilizadas cumplieran con el criterio de inclusión principal y no cupiera la posibilidad de una infección por patógeno de transmisión sexual, que no se detectó y que pudiera alterar los resultados esperados.

Al observar la Figura 4 se obtiene el primer grupo de muestras que resultaron positivas para infección con el virus del papiloma humano (muestras 1; 3; 4 y el control positivo) junto con una muestra negativa para infección con VPH (muestra 5). En la reacción de PCR el ADN del virus presente en las muestras amplificó por la acción de los cebadores MY09 y MY11, esta secuencia corresponde a un tamaño aproximado de 450 pb (Depuydt, *et al.* 2007). Estos resultados fueron observados de la misma forma para el resto de las muestras positivas para VPH. Con estos resultados se seleccionaron las muestras que cumplieron con la primera parte del criterio de inclusión principal (con y sin infecciones por VPH de alto riesgo).

La hibridación del producto de amplificación (amplicones) de las muestras positivas para infección por VPH se logró mediante unión por complementariedad de bases entre sondas presentes en la membrana y los amplicones, bajo condiciones de altas temperaturas y baja concentración de sales en los tampones de hibridación para lograr mayor especificidad. Gracias a esto se determinaron aquellos genotipos que fueran de alto riesgo que sirvieron para comparar el proteoma de las muestras con aquellas que carecieran de infección por VPH (Immunization, Vaccines and Biologicals, 2009). Genotipos de bajo riesgo, de riesgo indeterminado también fueron identificados (porque se desconoce si poseen capacidad para generar lesiones que puedan evolucionar en carcinomas (Muños *et al.*, 2003)). Por último también hubo muestras con genotipos no identificados debido a que la membrana carecía de sondas con las secuencias complementarias (Immunization, Vaccines and Biologicals, 2009).

Al observar la Figura 5 se obtiene el conjunto de muestras que resultaron positivas para *C. trachomatis*; las muestras 28; 29 (aunque con bandas muy débiles) y el control positivo, junto con las muestras negativas (30; 31 y 32). Durante la reacción de PCR, el material genético del plásmido de *C. trachomatis*

presente en las muestras amplificó por la acción de los cebadores KL1 y KL2 obteniendo un fragmento de 241 pb (Jenab, et al., 2010; Bas *et al.*, 1995).

Al observar la Figura 6 se obtiene el grupo de muestras que fueron seleccionadas para el ensayo de PCR de *U. urealyticum*, de las cuales solo en el control positivo hubo amplificación del genoma de *U. urealyticum*. El fragmento amplificado por los cebadores UMA y UMS posee un tamaño de 476 pb (Konget *al.*, 2009).

En las Figuras 7 y 8 se observan los grupos de muestras seleccionados para conformar los “pooles” de muestras sanas (pool X) y muestras infectadas (pool Σ) (respectivamente). El pool X está compuesto por las muestras 6; 7; 13 y 14; mientras que el pool Σ está compuesto por las muestras 1; 3; 17 y 32. Al analizar las figuras 7 y 8, el control interno está presente en todas las muestras con una banda de 918pb (SEEPLEX[®], 2015), demostrando el éxito de la amplificación. En la figura 8, el pool de muestras positivas para *C. trachomatis* y *U. urealyticum* solo tuvo amplificación de *U. urealyticum*, esto se observa por la aparición de una banda de aproximadamente 130 pb (a pesar de que el marcador no aparece en la fotografía del gel de agarosa, se presume que dicha banda pertenece a *U. urealyticum* por su bajo peso molecular) (SEEPLEX[®], 2015). La posible explicación de que solo ocurriera amplificación de *U. urealyticum* es debido a que probablemente la concentración del ADN de *C. trachomatis* estuviera por debajo de la medida detectable para la amplificación.

En la figura 8 el control positivo del Kit STD 6, amplificó para 4 de las 6 bandas que corresponden con *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis* con los pesos moleculares (647; 502; 410 y 314 pb, respectivamente) (SEEPLEX[®], 2015). Las bandas de los pesos moleculares más bajos del control positivo que no amplificaron correspondían a *Neisseria gonorrhoeae* y *Ureaplasma urealyticum* (214 y 130 pb, respectivamente),

probablemente debido a una mala manipulación de los reactivos del Kit, los cuales son muy sensibles. Con estos resultados se seleccionaron las muestras que cumplieron con la segunda parte del criterio de inclusión principal (sin infecciones por otros patógenos de transmisión sexual).

Con respecto al ensayo de extracción de proteínas, los resultados obtenidos por la medición de absorbancias a 280 nm de las muestras permitió conocer la concentración relativa de proteínas en las muestras antes y después de precipitar, demostrando que la acetona precipitó de manera eficiente las proteínas halladas en el fluido cérvico-vaginal, esto es debido a la capacidad que tiene la acetona como solvente orgánico para interactuar con los grupos polares de las proteínas (Macarulla y Goñi, 2001). Además la acetona al ser comparada con otros solventes permite obtener precipitados más puros y concentrados de proteínas (Ramírez *et al.*, 2009). Por otro lado acetona permite extraer proteínas que pueden permanecer inalteradas por tiempo prolongado (PIERCE, 2005).

Por otro, lado los valores de porcentaje de rendimiento de extracción son muy variables en todas las muestras para las dos condiciones. La acetona pura funciona como un poderoso agente para ensayos de precipitación de proteínas, permitiendo obtener rendimientos de extracción por encima del 60 % (Bravo *et al.*, 2011). El problema es que al aumentar la concentración de acetona en la proporción acetona-muestra, este rendimiento puede verse afectado, disminuyendo su capacidad por debajo del 50% (Bravo *et al.*, 2011). Para este trabajo se utilizó una proporción de 2:1 de acetona-muestra para la precipitación de proteínas.

Otra razón por la que los valores de rendimiento de extracción son tan variables podría radicar en la naturaleza de las muestras. Las células epiteliales del tracto genital femenino están influenciadas por los niveles de estrógeno de cada individuo, al cambiar los niveles de estrógeno en las pacientes la producción

y composición del FCV se ve afectada (Baquenado *et al.*, 2014). El FCV puede tornarse más o menos concentrado en aminoácidos y flora microbiana, dependiendo de los niveles hormonales de cada mujer, los cuales también pueden ser influenciados por factores externos a los que cada paciente está sometida como dieta, edad, higiene personal, etc. (Zegels *et al.*, 2009; Martín *et al.*, 2008). Por otro lado, la presencia de infecciones (en este caso VPH) también puede jugar un papel importante en los componentes hallados en el FCV (Baquenado *et al.*, 2014; Quayle, 2002; Martín *et al.*, 2008).

Tampoco se puede descartar la presencia de proteasas en la solución que degradarían las proteínas por lo cual el rendimiento sería menor (Bravo *et al.*, 2011).

Con respecto al isoelectroenfoco, se puede observar, aunque con una resolución media, una diferencia entre los patrones proteicos de las muestras positivas y negativas para VPH, lo cual sugiere que de alguna manera la infección por VPH tiene un efecto en la expresión de proteínas encontradas en el FCV. Los resultados presentados por Zegels y col. (2009) demostraron la expresión de proteínas constitutivas presentes en muestras de FCV pertenecientes a un grupo de pacientes; éstas cumplen funciones de defensa en presencia de agentes patógenos y su expresión cambia de acuerdo a la presencia de dichos agentes patógenos. Por otro lado Mitra y Beigi (2015) y Di Quinzo y col. (2007), comentan cómo la expresión de proteínas presentes en el FCV observadas en ensayos de electroforesis en dos dimensiones proporcionan información sobre cambios de expresión que pueden conducir a la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico al comparar muestras procedentes de pacientes sanos con pacientes (pacientes femeninos) que presentan algún tipo de enfermedad asociada al tracto genital y cómo dichos biomarcadores pueden ser utilizados para conocer las rutas metabólicas que conducen a un estado de infección determinado, respectivamente.

Considerando las evidencias anteriormente mencionadas, es posible pensar que las infecciones por VPH de alto riesgo pueden desencadenar algún cambio en las proteínas constitutivas del FCV.

Por otra parte se conoce que en infecciones con VPH de alto riesgo ocurre una sobre expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular p16 y p53 (Smith *et al.*, 2010), no se descarta la posibilidad que entre los patrones de proteínas hallados en la Figura 9, alguno pueda pertenecer a dichas proteínas. Solo con ensayos donde se determine por espectrofotometría de masa será posible si estos patrones coinciden o no con la sobre expresión de las proteínas p16 y p53.

Del igual forma, de acuerdo a los estudios de Honeggeret y col. (2015) las proteínas de expresión temprana de los tipos de VPH de alto riesgo alteran de forma negativa la expresión de p21, una proteína reguladora del ciclo celular a través de una cascada de reacciones que implican la sobre expresión de secuencias de microARN's específicos. Estos microARN's son importantes porque alteran la expresión post transcripcional de algunas proteínas, permitiendo la formación y posterior proliferación de tumores en el endocérnix (Honeggeret *al.*, 2015). Con estas evidencias se puede pensar que entre las modificaciones post transcripcionales producidas por las infecciones con VPH de alto riesgo (y las secuencias de microARN's), ocurra una alteración de las proteínas constitutivas del FCV o las proteínas de la superficie de las células del tejido de las paredes del endocérnix.

Por otro lado, se sabe que la proteína de expresión temprana E6 del VPH de alto riesgo puede alterar la organización epitelial y diferenciación celular al unirse a proteínas superficiales de las células epiteliales o a otras proteínas que controlan la adhesión y proliferación celular del tejido de las paredes del endocérnix (Lizano *et al.*, 2009). Si las interacciones entre la proteína E6 con las proteínas

superficiales de las células epiteliales del endocérnix producen algún tipo de cambio de configuración tridimensional en las proteínas, lo cual altera su función y posiblemente su carga eléctrica, es muy probable que en ensayos de electroforesis en dos dimensiones se puedan observar dichos cambios de las proteínas del FCV. Basados en éstas afirmaciones se podría intuir que la diferencia observada en los patrones de la Figura 9 (a pesar de poseer una resolución media) para las muestras sanas y las muestras infectadas por VPH de alto riesgo esté en parte influenciada por las interacciones de E6 con las proteínas del FCV, solo con repeticiones de éstos geles se podrá confirmar la diferencia de los patrones de proteínas de muestras de sanas e infectadas con VPH

Por su parte Schlecht y col. (2015) demostraron que las infecciones con VPH de alto riesgo producen hipermetilaciones en diferentes loci GpC, alterando secuencias de diversos genes, lo que refleja un cambio de expresión de sus proteínas. Entre los loci afectados está el gen CDKN2A que codifica para p16 y su marco de lectura alternativo p14 que se conocen que intervienen en el ciclo celular durante la formación de tumores. Considerando la hipermetilación del genoma como otro mecanismo post transcripcional utilizado por el VPH de alto riesgo durante su ciclo de infección, es posible pensar que la hipermetilación de algún locus específico se refleje con una alteración en las proteínas traducidas por ese locus, pero no es posible saber con certeza si éste mecanismo produce alteraciones visibles en ensayos de electroforesis en dos dimensiones. Solo futuros ensayos con espectrofotometría de masa permitirían identificar las proteínas presentes en los patrones de los geles y determinar si estas proteínas han sufrido cambios por alteraciones en las secuencias que las codificaron.

10.- Conclusiones

- Se determinó con un valor estadísticamente significativo que el método alternativo de lavado vaginal recolecta mayor cantidad de ADN y con mayor calidad de pureza.
- Se determinó con un valor estadísticamente significativo que el método alternativo de lavado vaginal logra reproducir ensayos de PCR para la detección de ADN de microorganismos patógenos con mayor eficiencia que el método de hisopado tradicional, disminuyendo los falsos negativos.
- La acetona permite preservar proteínas por largos períodos de tiempo antes de ser utilizadas en para los ensayos de cuantificación y electroforesis.
- El % de rendimiento de las muestras de FCV presentarán considerables variaciones entre cada una de las muestras debido a los diversos factores biológicos a los que éstas están influenciadas.
- Debido a que infecciones causadas por agentes patógenos pueden alterar la expresión de las proteínas constitutivas del FCV es probable que las infecciones por VPH alto riesgo también alteren dicha expresión.
- Futuros ensayos de espectrofotometría de masa permitirán la identificación y cuantificación de las proteínas del FCV que pueden presentar una alteración a causa de infecciones por VPH de alto riesgo.

11.- Recomendaciones

- Incluir inhibidores de proteasas en los protocolos de toma de muestra y precipitación de proteínas.
- Adicionar ácido tri-cloro acético (TCA) a la solución de acetona para optimizar la precipitación de proteínas.
- Utilizar un mayor número de muestras para los pooles de muestras sanas e infectadas, para repetir los ensayos de electroforesis en dos dimensiones hasta obtener patrones de proteínas con mejor resolución.

- Realizar tinción con nitrato de plata para mejorar resolución de los patrones de proteínas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar Y. (2014). Utilidad de la determinación inmuohistoquímica de la proteína p16 en el carcinoma de lengua, correlación con la infección por el virus del papiloma humano. Tesis Doc. Universidad de Málaga.
- Amaru, R; Peñaloza, R; Míguez, H; Torres G. y Cuevas, H. (2008). UMSAgen, método para la extracción simultanea de ARN y ADN para diagnóstico molecular. Cuadernos. 53(1), 38-43.
- Atencio R. (2008). Diagnóstico molecular del virus del herpes simple y virus de papiloma humano en mujeres con lesiones preinvasivas de cuello uterino. Tesis Mag. Universidad del Zulia Maracaibo.
- Bas, S; Griffais, R; Kvien, T; Glennas, A; Melby K. and Vischer T. (1995). Amplification of plasmid and chromosome *Chlamydia* DNA in synovial fluid of patients with reactive arthritis and undifferentiated seronegative oligoarthropathies. Arthritis & Rheumatism. 38(7), 1005-1013.
- Baquenado, L; Beltrán, E; Durán, M; Cancelo, M; Navarro, M; y Orte T. (2014). Salud Vaginal. [Documento en línea]. AEEM[®].Menoguía[®]. Asociación Española Para El Estudio de la Menopausia. Disponible en:<http://www.aeem.es/documentos/menoguias/MENOGUIASALUDVAGINAL.pdf>. [Consulta Junio 12, 2016].
- BioRad[®]. (2001). 2-D Electrophoresis for Proteomics: A Methods and Product Manual. [Documento en línea]. TheProteome Works SystemTM. Disponible en: http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_2651.pdf. [Consulta: Octubre 29, 2015].
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 72(2), 248-252.

- Bravo K. Muños K. Calderón J. y Osorio E. (2011). Desarrollo de un método para la extracción de polifenol oxidasa de uchuva (*Physalis peruviana* L.) y aislamiento por sistemas bifásicos acuosos. *Vitae*. 18(2), 124-132.
- Campbell N. y Reece J. 2007. Biología. Madrid: (7^{ma} Edición). Panamericana.
- Carrillo, C; García, G; Blanco, M; Caraballo, L y Venegas, C. (2010). Detección del virus papiloma humano: influencia del tipo de muestra y la severidad de la lesión intraepitelial cervical. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 70(4), 240-248.
- Carrillo, C; López, G; González, M; Caraballo, L y Venegas, C. (2010). Detección del virus del papiloma humano: influencia del tipo de muestra y la severidad de la lesión intraepitelial cervical. *Rev Obste Ginecol Venez*. 70(4), 240-248.
- Center for Diseases Control and Prevention (2015). STD Surveillance [Documento en línea]. Disponible: <http://www.cdc.gov/std/stats14/other.htm#hpv>. [Consulta: Julio 16, 2016].
- Cruz J. Márquez L. Quintero M. Bastidas M. y Puig Pons, J. (2013). Estudio de variantes intra-tipo del virus del papiloma humano tipo 16, por análisis nucleotídico de la región MY09-MY11. *Rev Obste Ginecol Venez*. 3(72), 187-194.
- Dasgupta, J; Bienkowsja-Haba, M; Ortega, M; Patel, H; Bodevin, S; Spillmann, D; Bishop, B; Sapp, M and Chen X. (2011). Structural basis of oligosaccharide receptor recognition by human papillomavirus. *J Biol Chem*. 286(4), 2617-2624.
- Depuydt, C; Boulet, G; Horvath, C; Benoy, I; Vereecken, A and Bogers, J. (2007). Comparison of MY09/11 consensus PCR and type-specific PCRs in the detection of oncogenic HPV types. *Molecular Diagnosis*. 4(11), 881-891.
- Di Quinzo, M; Oliva, K; Holdsworth, S; Ayhan, M; Walker, S; Rice, G; Georgiou, H and Permezel M. (2007). Proteomic analysis and characterisation of human cervico-vaginal fluid proteins. *Australian and New Zealand journal of obstetrics and gynecology*. 7(49), 9-15.

- Garrido, A; Teijón, J; Blanco, D; Villaverde, C; Mendoza, C y Ramírez, J. (2006). Fundamentos de bioquímica estructural. Madrid:(2^{da} Edición). Tebar.
- Görg, A; Klaus, A; Lück, C; Weiland, F and Weiss, W. (2007). Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis. [Documento en línea]. Proteomik. Technical University of Munich-Weihenstephan Science Center.Disponible en: <http://www.wzw.tum.de/proteomik/>. [Consulta: Octubre 29, 2015].
 - Görg A. (2004). 2-D Electrophoresis: Principles and methods. [Documento en línea]. GE Healthcare® Technical University of Munich. Disponible en: http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/2-D%20Electrophoresis.pdf. [Consulta: Octubre 29, 2015].
- Honegger, A; Schilling, D; Bastian, S; Sponalger, J; Kuryshev, V; Sülthmann, H; Hoppe-Seyler, K and Hoppe-Seyler F. (2015). Dependence of Intracellular and Exosomal microRNAs on Viral E6/E7 Oncogene Expression in HPV-positive Tumor Cells. PLOS Pathogens. 11(3), 1-33.
- Immunization, Vaccines and Biologicals. (2009). Human Papilloma Virus: laboratory manual. [Documento en línea]. World Health Organization®. Disponible en : www.who.int/vaccines-documents/. [Consulta: Julio 12, 2016]
- Jenab, A; Roghanian, R; Golbang, N; Golbang, P and Chamani-Tabriz, L. (2010). Comparison of three methods of DNA extraction in endocervical specimens for *Chlamydia trachomatis* infection by spectrophotometry, agarose gel and PCR. Arch Immunol. 1(58), 227-234.
- Jiménez A. (2009). Comparación de tres métodos de extracción y purificación de ADN a partir de restos óseos para análisis forenses. Tesis Br. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Knappe, M; Bodevin, S; Selinka, H; Spollmann, D; Steeck, R; Chen, X; Lindahl, U and Sapp, M. (2007). Surface-exposed amino acid residues of HPV16 L1 protein mediating interaction with cell surface heparan sulfate. J Biol Chem. 282(38), 27913-27922.

- Kong, F; Ma, Z; James, G; Gordon, S and Gilbert, G. (2000). Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-based assays. *Journal of clinical microbiology*. 3(38): 1175-1179.
- Lizano, M; Carrillo, A y Contreras, A. (2009). Infección por virus del papiloma humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis. *Cancerlogía*. 4(50), 205-216.
- López, A y Lizano, M. (2006). Cáncer Cérvicouterino y el Virus del Papiloma Humano: La Historia que No Termina. *Cancerlogía*. [Documento en línea]. Disponible:<http://www.incan.org.mx/revistaincan/elementos/documentosPortada/1172193073.pdf>. [Consulta: Julio 16, 2016]
- Macarulla, J y Goñi, F. (2002). *Biomoléculas: Lecciones de bioquímica estructural*. Barcelona:(3^{ra} edición). Reverté.
- Macarulla, J y Goñi, F. (2001). *Bioquímica Estructural: Conceptos y test*. Barcelona:(2^{da} edición). Reverté.
- Martín, R; Soberón, N; Vázquez, F y Suárez J. (2008). La microbiota vaginal: Composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 26(3), 160-167.
- Méndez C. (2012). *Manual de toma de muestras*. Sevilla. (1^{ra} edición).
- Mittra A. and Beigi M. (2015). Application of gel-based proteomic technique in female reproductive investigations. *Journal of human reproductive sciences*. 1(8), 18-24.
- Muños, N; Bosch, X; Sanjosé, S; Herrero, R; Castellsague, X; Shah, K; Snijders, P; and Mijer, C (2003). Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 6(348), 518-527.
- Perandrés R. (2010). Identificación de proteínas fosforiladas en células B mediante Pro-Q Diamond y espectrometría de masas. Tesis Msc. Instituto de parasitología y biomedicina López Neira. Granada.
- Picket, M; Everson, J; Pead, P and. Clarke, I. (2005). The plasmids of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydophila pneumoniae* (N16): accurate

determination of copy number and the paradoxical effect of plasmid-curing agents. *Microbiology*. 151(3), 893-903.

- PIERCE. (2005). Protein Stability and Storage [Documento en línea] PIERCE® biotechnology, Inc. Disponible: http://www.indiana.edu/~lchenlab/protocol_files/protein_storage.pdf. [Consulta: Julio 06, 2015].
- Quayle A. (2002). The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *Journal of Reproductive Immunology*. 1(57), 61-79.
- Raemdock, G; Tjalma, W; Coen, E; Depuydt, C and Ostade, X. (2014). Identification of Protein Biomarkers for Cervical Cancer Using Human Cervicovaginal Fluid. *PLoS ONE*. 9 (9), 1-9.
- Ramírez, G; Heil, M; Adame, R; Ramírez, D and Durán F. (2009). Análisis de proteínas en granulos y hojas de *Acacia hindsii* y en hormigas de la región de Irapuato. *Centro de Investigación y estudios avanzados, Campus Guanajato*. 23 (1), 1-4.
- Rangel, E; Vega, M; Martínez, J y Domínguez J. (2013). Determinación de VPH y de la proteína p16 en lesiones periungueales. *Dermatol Rev Mex*. 1(57), 99-103.
- Rivera, R; Delgado, J; Painel, V; Barrero, R y Larraín, A. (2006). Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical. *ChilObstetGinecol*. 71(2), 135-140.
- Sartor, M; Dolinoy, D; Jones, T; Colacino, J; Prince, M; Carey, T and Rozek L. (2011). Genome-wide methylation and expression differences in HPV(+) and HPV(-) squamous cell carcinoma cell lines are consistent with divergent mechanisms of carcinogenesis. *Epigenetics*. 6(6), 777-787.
- Sanabria J. (2009). Virus del Papiloma Humano. [Documento en línea]. Disponible: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/histologia/virusdelpapilomahumano_sanabria.pdf. [Consulta: Julio 16, 2016].
- Siegel N. and Castellan N. (1998). Estadística No Paramétrica aplicada a la ciencia de la conducta. México D.F. (4^{ta} edición). Trillas.

- Schlecht, N; Ben-Dayana, M; Anayannis, N; Lleras, R; Thomas, C; Wang, Y; Smith, R; Burk, R; Harris, T; Childs, G; Ow, T; Prystowsky, M and Beldin, T. (2014). Epigenetic changes in the CDKN2A locus are associated with differential expression of P16INK4A and P14ARF in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Medicine*. 4(3), 342-353.
- SEEPLEX[®]. (2015) STD 6 ACE Detection (V2.0). [Documento en línea]. Seegene[®] Inc. Disponible: <http://www.seegene.com/neo/en/products/instruments/seeamp.php>. [Consulta: Febrero02, 2016].
- Smith, E; Rubenstein, L; Hoffman, H; Haugen, T and Turek, L. (2010). Human papillomavirus, p16 and p53 expression associated with survival of head and neck cancer. *Infectious Agents and Cancer*.5(4), 1-10.
- Soria, D; Canchola, G; Lara, C; Sánchez, J; Hernández, R y Ortiz, C. (2013). Carcinoma epidermoide orofaríngeo metastásico en ganglios linfáticos cervicales asociado a los subtipos 16 y 45 del virus del papiloma humano (VPH) Estudio clínico, morfológico y molecular de dos casos. *Gaceta Médica de México*. 149(2), 673-679.
- Voet, D; Voet, J y Pratt, C. 2007. Fundamentos de Bioquímica. Buenos Aires-Argentina. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana. Pp: 101-107.
- Zegels, G; Raemdock, G; Coen, E; Tjalma, W and Ostade, X. (2009). Comprehensive proteomic analysis of human cervical-vaginal fluid using colposcopy samples. *Proteome Science*. 7(17), 1-17.
- Zelada A. y Fando R. 2013. La pandemia subvalorada del siglo XXI: el virus del papiloma humano, su repercusión en la patogenia del cáncer cérvicouterino. *Revista CENIC*. 2(44),1-21.