

Capacidad discriminativa del oncogén E7-VPH-AR en biopsias de cérvix con diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) tomadas en un centro de tamizaje de cáncer de cuello uterino del nororiente colombiano.

Diego Andrés Becerra Delgado

Trabajo de grado para optar por el título de Especialista en Patología

Director

Ernesto García Ayala

Médico Patólogo

Codirector

Tania Mendoza Herrera

Médica Epidemióloga

Universidad Industrial De Santander

Facultad de Salud

Escuela de Medicina

Departamento de Patología

Especialización en Patología

Bucaramanga

2026

Agradecimientos

A mis padres, por su amor incondicional y por ser el sostén permanente en cada etapa de mi vida.

A Samantha, cuya amistad, compañía y apoyo emocional fueron esenciales durante este proceso.

A mis amigos, por su presencia y por las risas que siempre renovaron mis fuerzas.

A mis compañeros de posgrado, gracias por su apoyo, compañerismo y por compartir cada aprendizaje y cada desafío.

A la Dra. Tania y al Dr. Jorge, grandes amigos y colegas, quienes, con su apoyo constante, orientación y palabras de aliento me ayudaron a no desistir en los momentos más complejos de este camino.

A la Universidad Industrial de Santander y a los profesores del Departamento de Patología, por su guía, sus enseñanzas y por cultivar en mí el rigor académico y la pasión por esta disciplina.

Al Laboratorio de Genética Molecular, Enfermedades Infecciosas y Cáncer de la Universidad Industrial de Santander, por su apoyo técnico y científico; en especial a la Dra. Brigitte Ofelia López y al Dr. Bladimiro Rincón, por su orientación experta y su disposición permanente para resolver cada duda que surgió en el proceso.

A la Liga Santandereana Contra el Cáncer, por su compromiso institucional y por facilitar espacios valiosos para la realización de este trabajo.

A todos quienes, de una u otra forma, hicieron parte de este camino, gracias por contribuir a la realización de este proyecto y a mi crecimiento personal y profesional.

Tabla de contenido

| | |
|--|----|
| Introducción..... | 11 |
| 1. Planteamiento y justificación del problema..... | 12 |
| 2. Marco teórico..... | 14 |
| 2.1 Definición y epidemiología..... | 14 |
| 2.2 Factores de riesgo..... | 15 |
| 2.3 Virus del papiloma Humano (VPH)..... | 15 |
| 2.4 Fisiopatología..... | 17 |
| 2.5 Diagnóstico..... | 18 |
| 2.6 Pruebas moleculares..... | 20 |
| 2.7 qPCR..... | 21 |
| 3. Pregunta de investigación..... | 23 |
| 4. Hipótesis de investigación..... | 23 |
| 4.1. Hipótesis nula..... | 23 |
| 4.2 Hipótesis alterna..... | 23 |
| 5. Objetivos..... | 24 |
| 5.1. Objetivo general..... | 24 |
| 5.2. Objetivos específicos..... | 24 |
| 6. Propósito..... | 24 |
| 7. Metodología propuesta..... | 25 |

CAPACIDAD DISCRIMINATIVA DEL ONCOGÉN E7-VPH-AR 4

7.1. Descripción del tipo del estudio..... 25

7.2 Población..... 25

7.3. Tamaño de la muestra..... 26

7.4 Selección de bloques de parafina.....27

7.5 Definición de variables..... 28

8. Procedimientos para la recolección de la información..... 31

8.1. Materiales y métodos..... 31

8.1.1 Selección de bloques de parafina..... 32

8.1.2 Resultado de biopsia de cérvix..... 32

8.1.3 Recolección, transporte y almacenamiento de los bloques de parafina..... 32

8.1.4 Preparación y desparafinado de muestras..... 33

8.1.5 Extracción de ADN para qPCR..... 34

8.1.6 qPCR..... 35

8.1.7 Cebadores para el gen E7 de VPH-AR..... 35

8.1.8 Control de extracción de ADN..... 37

8.2. Análisis estadístico..... 38

8.2.1 Análisis univariado..... 38

8.2.2 Análisis bivariado..... 38

9. Consideraciones éticas..... 38

10. Tratamiento de datos personales..... 40

| | |
|--|----|
| CAPACIDAD DISCRIMINATIVA DEL ONCOGÉN E7-VPH-AR | 5 |
| 11. Resultados..... | 41 |
| 11.1 Análisis univariado..... | 41 |
| 11.2 Análisis bivariado..... | 46 |
| 11.3 Resultados qPCR..... | 51 |
| 12. Discusión..... | 64 |
| 12.1 Rendimiento diagnóstico de la citología comparada con la biopsia..... | 64 |
| 12.2 Desempeño de la qPCR dirigida al gen E7 del VPH..... | 65 |
| 12.3 Relación entre carga viral y severidad histológica..... | 66 |
| 12.4 Asociación entre variables sociodemográficas, citología, biopsia y PCR..... | 67 |
| 12.5 Fortalezas del estudio..... | 67 |
| 12.6 Limitaciones y posibles sesgos..... | 68 |
| 12.7 Implicaciones clínicas..... | 68 |
| 13. Recomendaciones para futuros estudios..... | 69 |
| 14. Conclusiones..... | 70 |
| 15. Cronograma de actividades..... | 71 |
| 16. Presupuesto..... | 73 |
| Referencias bibliográficas..... | 75 |
| Apéndice A..... | 82 |
| Apéndice B..... | 83 |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Cálculo tamaño de muestra..... | 27 |
| Figura 2. Cebadores VPH-AR..... | 37 |
| Figura 3. Cantidad de muestras recolectadas..... | 41 |
| Figura 4. Datos ginecológicos..... | 43 |
| Figura 5. Uso de métodos anticonceptivos..... | 44 |
| Figura 6. Resultados carga viral VPH-16..... | 55 |
| Figura 7. Resultados carga viral VPH-31..... | 56 |
| Figura 8. Resultados carga viral VPH-33..... | 57 |
| Figura 9. Resultados transcritos RPP30..... | 62 |
| Figura 10. Resultados electroforesis para B-tubulina..... | 63 |
| Figura 11. Presupuesto..... | 74 |

Lista de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Cálculo tamaño de muestra..... | 26 |
| Tabla 2. Variables del estudio..... | 28 |
| Tabla 3. Tamaño de cebadores..... | 36 |
| Tabla 4. Medidas estadísticas edad..... | 42 |
| Tabla 5. Resultados citología..... | 45 |
| Tabla 6. Resultados biopsia..... | 45 |
| Tabla 7. Asociación de variables cuantitativas con resultado de biopsia alterada..... | 47 |
| Tabla 8. Asociación de variables dicotómicas con resultado de biopsia alterada..... | 48 |
| Tabla 9. Categorías concordantes entre citología y biopsia..... | 49 |
| Tabla 10. Análisis de concordancia citología y biopsia..... | 50 |
| Tabla 11. Desempeño diagnóstico citología frente a biopsia..... | 51 |
| Tabla 12. Distribución de genotipos de VPH..... | 52 |
| Tabla 13. Carga viral mínima y máxima para cada genotipo detectada en 48 ng de ARN por UL53 | |
| Tabla 14. Genotipos según categoría de biopsia..... | 58 |
| Tabla 15. Variables sociodemográficas y ginecoobstétricas contra carga viral de VPH-16. | 60 |
| Tabla 16. Matriz 2×2 de la PCR para VPH de alto riesgo frente al diagnóstico histopatológico...61 | |
| Tabla 17. Cronograma de actividades marzo 2023 a septiembre 2024..... | 71 |
| Tabla 18. Cronograma de actividades octubre 2024 a noviembre 2025..... | 73 |

Lista de apéndices

| | |
|-----------------|----|
| Apéndice A..... | 82 |
| Apéndice B..... | 83 |

Resumen

Título: Capacidad discriminativa del oncogén E7-VPH-AR en biopsias de cérvix con diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) tomadas en un centro de tamizaje de cáncer de cuello uterino del nororiente colombiano*

Autor: Diego Andrés Becerra Delgado**

Palabras clave: Virus del Papiloma Humano, Reacción en Cadena de la Polimerasa, Displasia del Cuello del Útero, Biopsia, Citología, Gen E7.

Introducción: El cáncer de cuello uterino es una causa importante de morbilidad y mortalidad, y está relacionado con la infección por VPH de alto riesgo. Aunque la biopsia es el estándar diagnóstico, puede no detectar todas las infecciones, lo que ha impulsado el uso de técnicas moleculares. Las pruebas basadas en PCR permiten identificar la infección viral y diferenciar genotipos de riesgo, constituyendo una alternativa diagnóstica potencialmente más sensible. **Objetivo:** Determinar la capacidad discriminativa de una qPCR dirigida al oncogén E7 del VPH de alto riesgo en biopsias cervicales con neoplasia intraepitelial cervical (NIC). **Materiales y métodos:** Estudio analítico en 63 biopsias con NIC 1, 2 y 3. El ADN se extrajo mediante salting out y se verificó con β -tubulina. La qPCR se realizó para 15 genotipos VPH-AR. Los datos citológicos, histopatológicos y moleculares se analizaron mediante estadística descriptiva y bivariada, estimando sensibilidad, especificidad, valores predictivos, likelihood ratios, AUC y concordancia diagnóstica. **Resultados:** La citología mostró sensibilidad de 88,9% y VPP de 66,6%. La qPCR-E7 presentó sensibilidad de 27,7% y especificidad de 75%, con concordancia mínima ($\kappa=0,02$). Tres genotipos mostraron carga viral detectable, principalmente en NIC3. Se evidenció degradación del material genético. **Conclusiones:** La qPCR-E7 tuvo bajo rendimiento, probablemente por degradación del ADN en muestras FFPE. Su mayor positividad en lesiones de alto grado sugiere utilidad potencial si se optimizan condiciones preanalíticas. La biopsia continúa como estándar diagnóstico.

*Trabajo de grado

**Facultad de Salud Universidad Industrial de Santander, Escuela de Medicina, Departamento de Patología. Director: Ernesto García Ayala, MD. Esp. Patología. Codirector: Tania Mendoza Herrera, MD. Esp. Epidemiología.

Abstract

Title: Discriminative Capacity of the E7 Oncogene of High-Risk HPV in Cervical Biopsies Diagnosed with Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) at a Cervical Cancer Screening Center in Northeastern Colombia

Author: Diego Andrés Becerra Delgado

Keywords: Human Papillomavirus, Polymerase Chain Reaction, Cervical Dysplasia, Biopsy, Cytology, E7 Gene.

Introduction: Cervical cancer is an important cause of morbidity and mortality and is associated with infection by high-risk human papillomavirus (HPV). Although biopsy is the diagnostic gold standard, it may not detect all infections, which has prompted the use of molecular techniques. PCR-based assays allow identification of viral infection and differentiation of risk genotypes, constituting a potentially more sensitive diagnostic alternative. **Objective:** To determine the discriminatory capacity of a qPCR assay targeting the E7 oncogene of high-risk HPV in cervical biopsies with cervical intraepithelial neoplasia (CIN). **Materials and Methods:** An analytical study was conducted on 63 biopsies with CIN 1, 2, and 3. DNA was extracted using the salting-out technique and integrity was verified with β -tubulin. qPCR targeting E7 from 15 high-risk HPV genotypes was performed. Cytological, histopathological, and molecular data were analyzed using descriptive and bivariate statistics, estimating sensitivity, specificity, predictive values, likelihood ratios, AUC, and diagnostic concordance. **Results:** Cytology showed a sensitivity of 88.9% and a positive predictive value of 66.6%. E7-qPCR demonstrated a sensitivity of 27.7% and specificity of 75%, with minimal concordance ($\kappa = 0.02$). Three genotypes showed detectable viral load, predominantly in CIN3. Degradation of genetic material was observed. **Conclusions:** E7-qPCR showed low performance, likely due to DNA degradation in FFPE samples. Its higher positivity in high-grade lesions suggests potential usefulness if pre-analytical conditions are optimized. Biopsy remains the diagnostic gold standard.

*Degree work

**Faculty of Health Sciences, Universidad Industrial de Santander, School of Medicine, Department of Pathology. Advisor: Ernesto García Ayala, MD. Pathology Specialist. Co-advisor: Tania Mendoza Herrera, MD. Epidemiologist Specialist.

Introducción

Según el Observatorio Global de Cáncer de la Organización Mundial de la Salud, para el 2020, el cáncer de cuello uterino (CCU) es la cuarta causa de incidencia de enfermedad oncológica y la cuarta causa de muerte en el mundo, mientras que en Colombia representa la tercera causa de incidencia de cáncer y la cuarta causa de muerte por cáncer, con una incidencia de 18,3 casos por cada 100000 habitantes y una mortalidad de 9,6 por cada 100000 habitantes (1,2).

El CCU se considera una lesión progresiva que va desde lesión intraepitelial de bajo grado o displasia leve hasta el carcinoma, estos cambios histopatológicos presentan una estrecha relación con la infección por Virus del Papiloma Humano (VPH), una de las asociaciones más fuertes dentro del estudio de la oncología humana (3).

La infección por VPH se clasifica según su riesgo de progresión a patologías oncológicas en: VPH de alto y bajo riesgo. Los genotipos de bajo riesgo se han asociado con mayor frecuencia a la aparición de verrugas genitales, mientras que los de alto riesgo se relacionan con el desarrollo de CCU, vagina, vulva, ano, pene y cavidad oral (4).

En Colombia las acciones en salud pública contra el CCU se centran en la prevención primaria mediante vacunación, y secundaria mediante la tamización. En nuestro medio es la citología cervicouterina la estrategia más utilizada para la detección de lesiones con potencial de malignidad (5). Sin embargo, se ha encontrado que hasta un 11,7% de personas con citologías vaginales reportadas como normales cursaban con una infección por VPH identificable mediante

otros métodos, debido a esto, se han planteado pruebas moleculares como herramientas alternativas de diagnóstico, permitiendo no solo la identificación de la infección viral sino la posibilidad de discriminar si se trata de un VPH de alto o bajo riesgo. En nuestro medio contamos con ofertas de tecnologías diagnósticas sustentadas en la amplificación por PCR, southern blot, dot blot e hibridación in situ; la mayoría de las cuales se basan en la detección del VPH (6).

1. Planteamiento y justificación del problema

El CCU se ha catalogado como una enfermedad de alto impacto en Salud Pública debido a que representa la cuarta causa de incidencia de enfermedad oncológica y la cuarta causa de muerte en el mundo, y la tercera causa de incidencia de cáncer y la cuarta causa de muerte por cáncer (1, 2).

El Virus del Papiloma Humano se clasifica en VPH de alto riesgo y de bajo riesgo según su capacidad de ocasionar CCU al infectar los queratinocitos del cérvix (3). Los virus de VPH de alto riesgo cuentan con la capacidad de sobre expresar oncogenes como los son E6 y E7 que conducen a la alteración de ciclo celular y favorecen la transformación del tejido en cáncer (7).

En la actualidad se realiza tamización de CCU mediante la toma de citología cervicouterina la cual muestra una sensibilidad cercana al 79% y una especificidad cercana al 81% que disminuye considerablemente al momento de diagnosticar lesiones intraepiteliales de alto grado (entre 42 y 61% respectivamente). La variabilidad de los datos anteriores corresponde con la calidad de la muestra, la experticia del profesional para identificar alteraciones, la

subjetividad en la interpretación de los resultados y las dificultades para el seguimiento de pacientes (5).

Por esta razón, se ha propuesto la implementación de pruebas moleculares para la detección del Virus del Papiloma Humano, ampliamente validadas y con una sensibilidad reportada de aproximadamente 95%. La mayoría de las pruebas moleculares se basan en la amplificación del Gen L1 de VPH debido a que es altamente conservado, sin embargo, puede presentar reacciones cruzadas con 180 genotipos diferentes de VPH de la piel y mucosas humanas que no causan enfermedad, provocando un alto porcentaje de pruebas indeterminadas (hasta un 15,8% de falsos negativos) (8). Adicionalmente se ha reportado una disminución del marco de lectura cuando el genoma del virus se integra al de la célula hospedadora (hasta en un 11% en VPH de alto riesgo) (9).

Por lo anterior, se han diseñado cebadores específicos hacia el oncogén E7, el cual se expresa de forma continua y creciente al integrarse con el ADN de la célula hospedera (6). Se ha visto que el gen E7 es indispensable en el mantenimiento y la transformación maligna, por lo cual su expresión no se pierde al integrarse con el ADN celular (10). La importancia de la carga viral ha sido objeto de debate en la progresión a CCU debido a la pérdida del margen de lectura de los genes para los cuales se han estandarizado pruebas moleculares (gen L1), sin embargo, al no haber pérdida de la expresión génica del E7 se ha podido establecer una posible relación entre la carga viral y la posibilidad de progresión de las lesiones premalignas (11).

Debido a lo expuesto es necesario implementar tecnologías que permitan un mejor rendimiento diagnóstico de neoplasias intraepiteliales que no pierdan sensibilidad ni especificidad al momento de establecer el estadio de la lesión, logrando de esta manera impactar

en los servicios de salud, mejorando la oportunidad en el diagnóstico de lesiones premalignas del cuello uterino.

2. Marco teórico

2.1 Definición y epidemiología

El cáncer de cuello uterino (CCU) es una entidad que se origina a partir de las células del tejido epitelial del cuello del útero, causada por la presencia de cepas oncogénicas del Virus del Papiloma Humano (VPH). Esta enfermedad se desarrolla a partir de lesiones precancerosas que evolucionan de manera gradual a adenocarcinoma o carcinoma de células escamosas, según el epitelio del que se originaron. Microscópicamente las lesiones se categorizan según la afección del epitelio y del grosor, los cuales se pueden clasificar en displasia leve (NIC 1), displasia moderada (NIC 2), displasia severa (NIC 3) y carcinoma *in situ*; para otras nomenclaturas la lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG) corresponde al NIC 1 y NIC 2, mientras que la lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG) corresponde a NIC 3 o carcinoma *in situ* (12, 13).

Según el Observatorio Global de Cáncer de la Organización Mundial de la Salud, para el 2020, el CCU se configuró como la cuarta causa de incidencia de enfermedad oncológica con 604000 nuevos casos, y la cuarta causa de muerte en el mundo con 342000 muertes en todo el mundo. En Colombia representa la tercera causa de incidencia de cáncer y la cuarta causa de muerte por cáncer, con una incidencia de 18,3 casos por cada 100000 habitantes y una mortalidad

de 9,6 por cada 100000 habitantes (1, 2). Mientras que en Bucaramanga se ha encontrado una incidencia del 17,3 por cada 100000 habitantes (2).

La infección por VPH es la infección de transmisión sexual más común en el mundo, se estima que, a lo largo de la vida sexual, cada persona se infectará como mínimo una vez con este virus (14). La prevalencia del VPH varía significativamente según el lugar geográfico, con una prevalencia mayor del 42,2% en países en desarrollo, en comparación con las regiones desarrolladas, donde fue del 22,6% (15).

2.2 Factores de riesgo

Existen varios factores de riesgo relacionados con los dos principales tipos histológicos de CCU, que se pueden dividir en factores relacionados y no relacionados con el VPH. Entre los relacionados con el VPH se encuentran: inicio temprano de la actividad sexual, múltiples parejas sexuales, tener una pareja sexual considerada de alto riesgo, antecedentes de infecciones de transmisión sexual, ser madre a temprana edad y tener múltiples embarazos; antecedentes de neoplasias o cáncer intraepitelial escamoso vulvar o vaginal, e inmunosupresión (16).

Los factores de riesgo no relacionados con el VPH son: bajo nivel socioeconómico (17), uso de anticonceptivos orales (18), consumo de tabaco y factores genéticos (16,19).

2.3 Virus del papiloma Humano (VPH)

El VPH es un virus que hace parte de la familia *Papillomaviridae*. Se compone de una cápside icosaédrica, que alberga una única molécula de ADN circular de doble cadena y carece de envoltura vírica (20). Se han identificado aproximadamente 205 especies de *Papillomavirus* los

cuales fueron clasificados en 5 géneros; el género *Alpha-Papillomaviruses (Alpha-PV)* es el que tiene mayor importancia clínica debido a que infecta tanto epitelio cutáneo como mucoso causando desde verrugas hasta lesiones neoplásicas (21). De la misma manera, se dividen en VPH de alto riesgo y VPH de bajo riesgo, según su asociación con el CCU y la aparición de lesiones precancerosas; los VPH de alto riesgo incluyen los genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59, los cuales se han clasificado como Carcinógenos de Grupo 1 según Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (22). El genotipo VPH 16 es el detectado con mayor frecuencia (hasta un 60,5%), seguido por el VPH 18 (23).

El genoma del VPH está compuesto por tres secciones: la región reguladora no codificante, la región de expresión tardía, formada por los genes L1 y L2, que codifican para capsómeros que forman la cápside viral. La región de expresión temprana formada por los genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7 que codifican para regiones no estructurales y desempeñan un papel crucial en la regulación de la replicación viral y en la oncogénesis (24). El gen E1 y E2 regulan la replicación del genoma viral y la transcripción de proteínas tempranas, mientras que E5, E6 y E7 son los que inducen la oncogénesis (23).

Se ha determinado que los transcritos de los de los genes E6 y E7 son los componentes esenciales en el proceso de desarrollo de cáncer en el cuello uterino, existen estudios que han registrado el papel de estos oncogenes con su papel en conferir inmortalidad a queratinocitos primarios en entornos de laboratorio y su capacidad para inducir la formación de tumores en monos transgénicos en estudios in vivo (7).

El E7 fue el primer oncogén descubierto, entre todos los oncogenes del VPH; la proteína E7 contiene una región denominada CR3 la cual codifica para un dominio de dedo de la cual es responsable de mediar la interacción de E7 con proteínas celulares responsables de la regulación del ciclo celular y la apoptosis (25). Por otro lado, E6 es una proteína con un dominio de unión a PDZ responsable de interactuar con varias proteínas celulares. De todos los tipos de interacciones celulares que sufren las oncoproteínas, la interacción más significativa es aquella en la que E6 puede degradar p53 y, en el caso de E7, la que inhibe la proteína pRb (23).

2.4 Fisiopatología

Dentro de la amplia variedad de más de 200 tipos de VPH identificados, y de los cuales más de 30 provocan infecciones en el tejido genital, existen 14 variantes con la capacidad de estimular el desarrollo de un crecimiento maligno en el cuello uterino, lo que las clasifica como cepas de alto riesgo. En estudios prospectivos se evidenció que entre un 15% y un 28% de pacientes en los que se detectó ADN de VPH desarrollaron lesiones intraepiteliales in situ en 2 años, comparados contra 1 a 3% en los que no se detectó ADN viral y desarrollaron lesiones. El riesgo de progresión para las variantes 16 y 18 del VPH es mayor llegando a alcanzar un 40% (26).

Las fases más cruciales en el proceso de formación de cáncer son: en primer lugar, la infección del tejido epitelial cervical, principalmente en la zona de transformación, posiblemente requiriendo algún tipo de lesión o microtrauma del epitelio. En segundo lugar, y uno de los procesos que parece desempeñar un papel fundamental en el origen de las células malignas es la integración del virus en el genoma del huésped. Actualmente, este proceso se considera

actualmente una alteración genética significativa que caracteriza las lesiones malignas y está relacionado con la pérdida o inactivación de genes. Estas integraciones, que se han estudiado con mayor detalle en el genotipo viral 16, ocurren en sitios específicos en la región E1-E2, interrumpiendo la secuencia y desencadenando la desregulación de las actividades de transcripción. En tercer lugar, se conduce a la sobreexpresión de las oncoproteínas virales. Las proteínas E6 y E7, por lo general, inhiben la función de los genes supresores de tumores, como p53 y pRb, lo que provoca una pérdida de control en puntos críticos del ciclo celular. De esta manera, promueven la progresión de lesiones preinvasivas y mantienen el fenotipo maligno. Este proceso de invasión puede tomar entre 10 y 20 años (7, 26).

2.5 Diagnóstico

Las guías de práctica clínica recomiendan realizar un examen físico que incluya un examen pélvico en pacientes con síntomas sospechosos (27). Durante el examen con espéculo, se examina visualmente el cuello uterino en busca de lesiones visibles, que pueden variar desde una apariencia normal hasta tumores grandes que reemplazan por completo el cérvix. Cualquier lesión visible debe someterse a biopsia, independientemente de los resultados previos de citología cervical benigna (27).

La citología cervicouterina es el método principal para la detección del cáncer de cuello uterino (CCU) en los Estados Unidos y es la prueba diagnóstica primaria de elección cuando se sospecha CCU, debido a que tiene una especificidad del 90% para detectar lesiones precancerosas (28). En otros países, como Australia, el Reino Unido y los Países Bajos, las

pruebas moleculares para detección del VPH de alto riesgo es el método principal para la detección del CCU, y la citología del cuello uterino se realiza solo si esta prueba es positiva (27).

En Colombia, las acciones de prevención para el cáncer de cuello uterino se focalizan en la vacunación contra el VPH y el tamizaje mediante citología cervicouterina, con el fin de prevenir lesiones premalignas y detectar de forma temprana para un tratamiento oportuno (29). No obstante, existen falencias en el programa nacional de detección de CCU, como la dificultad de acceso a los servicios de salud, la subjetividad en la lectura de las muestras citológicas, la pérdida de seguimiento de los pacientes, así como la inoportunidad para la confirmación diagnóstica y el tratamiento de las lesiones premalignas o cancerígenas. Todos estos factores impactan de manera negativa las Rutas Integrales de Atención para la prevención y atención oportuna de CCU, impidiendo que se cumplan los objetivos del programa en la reducción de la morbimortalidad por esta patología, aun teniendo acciones preventivas (30).

La colposcopia de cuello uterino deberá utilizarse según la positividad de las pruebas de tamizaje y el nivel de sospecha clínica, y la decisión de realizar una biopsia de cérvix podrá diferirse según los hallazgos durante la colposcopia realizada por personal entrenado (5).

La biopsia se considera el estándar de oro en la evaluación de la patología neoplásica cervical, ya que el análisis histológico proporciona información concluyente para establecer un diagnóstico preciso. Existen diferentes métodos para realizar una biopsia cervical, entre ellos la biopsia en sacabocados, la conización con bisturí y la biopsia con asa diatérmica (31).

2.6 Pruebas moleculares

Teniendo en cuenta lo anterior, el Instituto Nacional de Cancerología (INC) en 2009, recomendó que en Colombia se adoptara el algoritmo de tamizaje aprobado por la FDA en el cual se incluían pruebas moleculares de detección del ADN de VPH en células del cuello uterino como una nueva herramienta para la detección de CCU(32). Por lo que, en el año 2011, el Ministerio de Salud y Protección Social implementó el uso de diferentes pruebas moleculares para el tamizaje de VPH dentro del Plan Obligatorio de Salud (5).

No obstante, para la detección de lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (HSIL), la citología cervicouterina no logra obtener una sensibilidad del 50% (33)Es por esto que se han desarrollado técnicas moleculares que presentan mayor sensibilidad en la detección de VPH y, además, permiten la genotipificación del virus (34).

Actualmente, la mayoría de las pruebas moleculares que existen en el mercado para la detección del VPH, consisten en la amplificación del gen L1 debido a que este es un gen estructural altamente conservado (35). Sin embargo, debido a que es un gen que codifica para una de las proteínas estructurales del virus, presenta reacción cruzada con otros subtipos de VPH que existen en la piel y mucosas, los cuales no generan lesiones neoplásicas y aumenta el número de resultados indeterminados (36). Otros estudios han demostrado que el marco de lectura abierto del gen L1 puede perderse cuando se integra el genoma del virus al de la célula hospedadora, lo cual sucede con cerca del 11% de las infecciones por genotipos de VPH-AR (9, 35).

Por lo anterior, se ha buscado el desarrollo de nuevas pruebas moleculares, principalmente PCR, que estén dirigidas al oncogén E7, el cual ha demostrado que no presenta modificación

cuando se realiza la integración viral y es expresado de manera continua debido a que tiene un rol fundamental en la oncogénesis (37).

2.7 qPCR

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método que permite generar millones de réplicas de una secuencia de ADN específica en un lapso de pocas horas (38). Esta actividad se desarrolla en un tubo de ensayo y abarca diversos ciclos, cada uno de los cuales consta de tres pasos distintos (38). La reacción involucra una pequeña muestra de ADN, utilizada como molde, que puede obtenerse de tejido fresco o de tejido incluido en parafina. Además de esto, se requieren oligonucleótidos que funcionan como cebadores, una ADN polimerasa termoestable, desoxirribonucleótidos que actúan como materia prima para generar las nuevas cadenas a partir del molde, y un buffer que tiene la función de estabilizar el proceso (38).

La primera fase de la reacción, denominada desnaturalización, consiste en la separación de las dos hebras de la estructura del ADN, llevándose a una temperatura que oscila entre 94 y 96 °C, manteniéndose durante un breve lapso. A continuación, se presenta el anillamiento o hibridación de los cebadores con las secuencias complementarias al ADN. Los cebadores son oligonucleótidos sintéticos que delimitan la región que se quiere amplificar, y se anillan a temperaturas en un rango entre 50 °C y 65 °C. La fase final, conocida como ciclo de extensión, dura entre 1 y varios minutos a una temperatura de 72 °C. En este punto, la enzima ADN polimerasa puede sintetizar nuevas hebras de ADN complementarias a las cadenas originales. A medida que la reacción progresa, se consigue amplificar el segmento de ADN seleccionado aproximadamente 10^7 veces (38).

La sencillez de la PCR, junto con la capacidad que ofrece para regular con precisión las condiciones de la reacción, la posibilidad de analizar pequeñas cantidades de diversos tipos de muestras y su versatilidad en áreas como la genética, las enfermedades infecciosas y el cáncer, la han convertido en la herramienta más poderosa y ampliamente empleada hasta la fecha en el ámbito del diagnóstico molecular y el seguimiento de tratamientos (38).

La PCR cuantitativa (qPCR) es una evolución de la PCR estándar, esta técnica se utiliza para determinar la cantidad de ácidos nucleicos presentes en una muestra de tejido. Esta característica permite medir con precisión la carga viral, es decir, la cantidad de ADN o ARN viral en una muestra de sangre o de tejidos de pacientes. Además, se utiliza para evaluar la actividad genética en diversos tipos de tejidos, actúa como un marcador biológico para detectar enfermedades, especialmente tumores, en sus etapas iniciales, y para monitorear la respuesta a tratamientos médicos (38).

Recientemente, el Laboratorio de Genética Molecular de Enfermedades Infecciosas y Cáncer de la Universidad Industrial de Santander estandarizó una qPCR para el oncogén E7 de 15 genotipos de VPH-AR, la cual mostró una sensibilidad del 95%. Esta prueba logró detectar 15,8% de falsos negativos que se estaban dando en la PCR del gen L1 (39). Adicional a las implicaciones en la detección de casos, la discrepancia entre estos dos métodos podría revelar detalles sobre cómo el virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) se integra en el genoma de la célula huésped. Esto es especialmente relevante, ya que se ha comprobado que la integración viral puede causar cambios en las vías genéticas, con el potencial de inducir la formación de tumores (40).

3. Pregunta de investigación

La qPCR para el gen E7 del VPH-AR cuenta con capacidad discriminativa similar al resultado histopatológico en muestras de biopsias de cérvix para establecer el diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC).

4. Hipótesis de investigación

4.1. Hipótesis nula

La qPCR para el gen el E7 de 15 genotipos de VPH-AR no cuenta con capacidad discriminativa similar a la biopsia de cérvix para establecer el diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical en biopsias de cérvix.

4.2 Hipótesis alterna

La qPCR para el gen el E7 de 15 genotipos de VPH-AR cuenta con capacidad discriminativa similar a la biopsia de cérvix para establecer el diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical en biopsias de cérvix.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

1. Determinar la capacidad discriminativa de la qPCR para el oncogén E7-VPH-AR en biopsias de cérvix con diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical.

5.2. Objetivos específicos

1. Establecer sensibilidad y especificidad de la qPCR para el diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical.
2. Determinar la asociación de la expresión del gen E7 del VPH-AR con el estadio histopatológico establecido (NIC 1, NIC 2 y NIC 3).
3. Definir puntos de corte de expresión del gen E7 del VPH-AR según estadiaje NIC 1, 2 y 3.
4. Establecer la reproducibilidad de la qPCR para el diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical.
5. Determinar la asociación entre las variables sociodemográficas y el resultado de carga viral de la qPCR.

6. Propósito

Con el presente estudio se busca evaluar pruebas diagnósticas alternativas no operador dependiente que permitan definir el estadio patológico de las Neoplasias Intraepiteliales de Cérvix, con el fin de mejorar el rendimiento diagnóstico, e impactar en la detección temprana de lesiones premalignas del CCU.

7. Metodología propuesta

7.1. Descripción del tipo del estudio

El presente fue un estudio observacional analítico de corte transversal con muestreo no probabilístico de evaluación de prueba diagnóstica (qPCR para el oncogén E7 en biopsias de cérvix), durante el cual se evaluaron variables paraclínicas y sociodemográficas tomadas del formato de reporte de citología y de biopsia de cérvix (estándar de oro para el diagnóstico de CCU) de un centro de referencia del nororiente colombiano.

7.2 Población

Población de referencia: biopsias de cérvix de pacientes con citología previa que presentan hallazgo de anormalidades celulares.

Población diana: biopsias de cérvix con diagnóstico histopatológico de NIC 1, 2, 3 o carcinoma *in situ*.

Población de estudio: biopsias de cérvix con diagnóstico histopatológico de NIC 1, 2 o 3 de la Liga Santandereana contra el cáncer.

7.3. Tamaño de la muestra

Para este estudio se calculó el tamaño de la muestra utilizando el software de código abierto OpenEpi versión 3,01, tomando los resultados obtenidos de PCR multiplex para la detección de VPH de alto riesgo en lesiones cervicales mediante cebadores para los genes E6 y E7, como está descrito en el artículo: “DNA-EIA to detect high and low risk HPV genotypes in cervical lesions with E6/E7 primer mediated multiplex PCR”. (Figura 1 y Tabla 1) (54).

Tabla 1

Cálculo tamaño de muestra

| | |
|--------------------------------|-------|
| Casos | 181 |
| Grupo no expuesto | (E7-) |
| Grupo expuesto | (E7+) |
| Relación no expuesto:expuesto | 1:1 |
| Probabilidad grupo no expuesto | 8.5% |
| Probabilidad grupo expuesto | 37% |
| Intervalo de confianza | 95% |
| Odds ratio | 6.4% |

Nota. La tabla presenta los parámetros utilizados para el cálculo del tamaño de la muestra. El cálculo del tamaño muestral se realizó siguiendo los criterios metodológicos descritos por Clavel, et al. (54).

Figura 1

Cálculo tamaño de muestra

| Tamaño muestral: transversal, de cohorte, y ensayo clínico | | | |
|---|---------------|---------------|----------------------|
| Nivel de significación de dos lados(1-alpha) | | | 95 |
| Potencia (1-beta,% probabilidad de detección) | | | 80 |
| Razón de tamaño de la muestra, Expuesto/No Expuesto | | | 1 |
| Porcentaje de No Expuestos positivos | | | 8.5 |
| Porcentaje de Expuestos positivos | | | 37 |
| Odds Ratio: | | | 6.4 |
| Razón de riesgo/prevalencia | | | 4.4 |
| Diferencia riesgo/prevalencia | | | 29 |
| | Kelsey | Fleiss | Fleiss con CC |
| Tamaño de la muestra - Expuestos | 34 | 33 | 40 |
| Tamaño de la muestra- No expuestos | 34 | 33 | 40 |
| Tamaño total de la muestra | 68 | 66 | 80 |

Nota. Tamaño de muestra calculado en OpenEpi 3,01 con razón no expuesto:expuesto 1:1, IC 95% y probabilidades de 8,5% (E7-) y 37% (E7+), según Clavel et al. (1998); total estimado: 181 casos.

7.4 Selección de bloques de parafina

Criterios de inclusión:

1. Biopsias de cérvix embebidas en parafina de pacientes mayores de 18 años con reporte de citología previa que informe anormalidades de las células epiteliales.

2. Biopsias de cérvix con resultado histopatológico NIC 1, 2 o 3.

Criterios de exclusión:

1. Biopsias de cérvix embebidas en parafina de pacientes con antecedente de conización.
2. Biopsias de cérvix embebidas en parafina almacenadas por más de 10 años (contabilizado desde febrero de 2024).
3. Los bloques de parafina se encuentran deteriorados (no cumplen con criterios de almacenamiento, presentan abolladuras, ralladuras y otros criterios que el investigador principal crea pertinentes).
4. Casos sin láminas de secciones histológicas.

7.5 Definición de variables

Tabla 2

Variables del estudio

| Nombre de la variable | Definición conceptual | Definición operacional | Escala de medición |
|--------------------------------------|--|-------------------------------|----------------------------------|
| Edad | Edad confirmada mediante el formato de informe de citología cervicouterina | Número entero en años. | Cuantitativo de razón, discreto. |
| Edad de inicio de vida sexual | Edad confirmada mediante el formato de informe de citología cervicouterina | Número entero en años. | Cuantitativo de razón, discreto. |

| Nombre de la variable | Definición conceptual | Definición operacional | Escala de medición |
|---|---|------------------------------------|---------------------------------|
| Número de compañeros sexuales en el último año | Cantidad confirmada mediante el formato de informe de citología cervicouterina | Número entero. | Cuantitativo discreto |
| Lugar de residencia | Ciudad de residencia el participante al momento de ingresar al estudio tomada del formato de informe de citología cervicouterina | Nombre de la ciudad de residencia. | Cualitativa nominal politómica |
| Uso de preservativo | Uso de preservativo durante todas sus relaciones sexuales, confirmado mediante el formato de informe de citología cervicouterina. | Usa, no usa. | Cualitativa nominal dicotómica. |

| Nombre de la variable | Definición conceptual | Definición operacional | Escala de medición |
|-------------------------------------|---|--|------------------------------------|
| Uso de método anticonceptivo | Método actual usado por el paciente confirmado mediante el formato de informe de citología cervicouterina | Tipo de método anticonceptivo: anticonceptivos orales, inyección mensual, inyección trimestral, implante subdérmico, dispositivo intrauterino, quirúrgico. | Cualitativa nominal politómica |
| Resultado de biopsia | Resultado de biopsia leída por patólogo de la Liga Santandereana Contra el cáncer. | NIC 1, NIC 2, NIC 3, Carcinoma in situ, | Cualitativa ordinal, politómica |
| Carga viral VPH según qPCR | Resultado de carga viral tomado del formato de reporte de carga viral de qPCR para E7 | Expresado en número racionales | Cuantitativa continua |

| Nombre de la variable | Definición conceptual | Definición operacional | Escala de medición |
|--------------------------------------|---|---|---------------------------------|
| Resultado de citología previa | Resultado de la última citología tomada al paciente con anomalías de células epiteliales. tomada del formato de informe de citología cervicouterina | ASC-US, ASC-H, LIE-BG, LIE-AG, carcinoma escamocelular. | Cualitativa ordinal, politómica |

Nota. La tabla organiza las variables del estudio y presenta, para cada una de ellas, su definición conceptual, su definición operacional y la escala de medición correspondiente.

8. Procedimientos para la recolección de la información

8.1. Materiales y métodos

En primera instancia, se realizó la presentación de la propuesta de investigación ante el comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander; una vez se obtuvo la aprobación por parte de dicho comité, se presentó la propuesta al comité de ética de la Liga Santandereana Contra el Cáncer y, con ello, la solicitud de permiso para iniciar la captación de los bloques de parafina.

Para el presente estudio se seleccionaron 66 bloques de parafina de biopsias de cérvix de pacientes con diagnóstico histopatológico NIC 1, 2 y 3 de la Liga Santandereana contra el Cáncer.

8.1.1 Selección de bloques de parafina

Se realizó la revisión de los registros de resultados de biopsias de cérvix realizadas desde febrero de 2014 hasta abril de 2024 en la Liga Santandereana Contra el Cáncer; posteriormente se confirmó la existencia de consentimiento informado para la reevaluación del resultado histopatológico de las muestras, a las cuales se les aplicó la lista de chequeo de criterios de inclusión y exclusión del estudio (Apéndice A). Cada caso fue identificado con un código único, conocido solo por el investigador principal. Consecutivamente, se realizó la revisión del formato de reporte de citología del mismo caso para consignar las variables clínicas y paraclínicas correspondientes, según el instrumento de recolección construido para tal efecto (Apéndice B).

8.1.2 Resultado de biopsia de cérvix

Se revisó el resultado de la biopsia leída por patólogos de la Liga Santandereana Contra el Cáncer y únicamente se incluyeron las biopsias con diagnóstico histopatológico de NIC 1, 2 y 3, tal y como está consignado en la lista de criterios de inclusión y exclusión.

8.1.3 Recolección, transporte y almacenamiento de los bloques de parafina

Los bloques de parafina que cumplieron con los criterios de inclusión planteados fueron identificados con un número serial único asignado por la Liga Santandereana Contra el Cáncer,

junto con los datos clínicos y sociodemográficos solicitados por el protocolo, sin identificación del paciente. El bloque de parafina fue embalado y transportado el mismo día de recepción en una cava limpia previamente esterilizada con luz ultravioleta (solo se utilizó una cava de transporte por bloque de parafina) al Laboratorio de Virología del Parque Tecnológico de Guatiguará, donde fueron almacenados en un cuarto limpio a temperatura ambiente dispuesto por el laboratorio dentro de las cavas de transporte, con el fin de evitar contaminaciones cruzadas.

En un plazo de dos días calendario después de recolectadas las biopsias, se realizó la qPCR siguiendo los protocolos establecidos. Una vez finalizada la prueba, las biopsias fueron devueltas a la Liga Santandereana Contra el Cáncer en un plazo no mayor a dos días.

8.1.4 Preparación y desparafinado de muestras

Los bloques de parafina fueron cortados en secciones de 4 μm de espesor mediante un micrótopo; la hoja del micrótopo utilizada para realizar el seccionamiento fue nueva y fue previamente tratada con una solución de hipoclorito a 5000 ppm durante 15 minutos y posteriormente irradiada en cámara de extracción con luz UV durante 30 minutos. Las hojas del micrótopo fueron cambiadas entre muestra y muestra para evitar que se presentara contaminación cruzada. Se colocó la muestra en un tubo Eppendorf de 2 mL, al cual se le agregaron 1200 μL de xilol, y se realizó vortex de manera vigorosa. Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 3600 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente (21 °C) y se retiró el sobrenadante utilizando una pipeta. Se agregaron 1200 μL de etanol (96–100 %) al sedimento y se centrifugó nuevamente a 3600 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante de etanol y se repitió el lavado con etanol en tres ocasiones. La muestra se incubó a 37 °C durante 15 minutos

para evaporar el etanol residual en el tejido. Finalmente, el sedimento del tejido fue resuspendido en 180 μ L de buffer ATL (41).

8.1.5 Extracción de ADN para qPCR

Se realizó la extracción del ADN mediante la técnica salting out (42). Se tomaron 100 μ L de la muestra desparafinada y purificada, la cual se centrifugó a 3500 rpm durante 8 minutos y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se agregaron 400 μ L de PBS, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos y se descartó nuevamente el sobrenadante.

Consecutivamente, se añadieron 600 μ L de WCLB (10 mM Tris-Cl pH 7,5, 10 mM EDTA pH 8,0, 50 mM NaCl) y 10 μ L de SDS al 10%, y se mezcló con vortex. La mezcla se incubó a 56 °C por 1 hora a 300 rpm hasta observar la digestión completa de las células, realizándose agitación en vórtex cada 15 minutos. Seguidamente, se adicionaron 150 μ L de NaCl 6 M y se homogeneizó con vórtex por 30 segundos. Luego, se incubó durante 5 minutos en frío para favorecer la precipitación de proteínas y se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos.

El sobrenadante fue transferido a un nuevo vial con cuidado de no remover el precipitado. A continuación, se añadieron 750 μ L de isopropanol (-20 °C) al sobrenadante, se mezcló por inversión durante 1 minuto hasta observar la aparición de la malla de ADN y se centrifugó a 13000 rpm por 6 minutos. El sobrenadante se eliminó por inversión con cuidado de no retirar el precipitado. Posteriormente, se realizó un lavado con 200 μ L de etanol al 70%, se centrifugó como se realizó anteriormente, se eliminó el sobrenadante por inversión y se retiró el exceso de etanol colocando el vial boca abajo sobre una toalla de papel limpia.

La muestra se llevó a secado en bloque seco a 40 °C y se resuspendió en 50 µL de buffer TE estéril, pH 7,5, y se incubó a 65 °C durante una hora a 300 rpm. Posteriormente, se realizaron vórtex y spin, y se determinó la concentración de DNA y la relación de absorbancia 260/280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Finalmente, el ADN se conservó a -20 °C.

8.1.6 qPCR

Se utilizó una PCR Master Mix (Thermo Scientific, DreamTaq Green, 2X) para realizar 20 amplificaciones en las que se modificaron las concentraciones de MgCl₂ (1,5 a 4 mM), cebadores (0,033 a 1,00 µM) y ADN (50 a 250 ng). Se crearon diferentes programas de PCR en el termociclador Multigene Gradient (Labnet, NJ, USA), con variación de la temperatura de anillamiento a 64 °C y el número de ciclos a 38. Se utilizaron como cebadores para la región del oncogén E7, los primers diseñados para 15 genotipos de VPH de alto riesgo.

8.1.7 Cebadores para el gen E7 de VPH-AR

Se utilizaron las sondas y cebadores para el oncogén E7 de los 15 genotipos de VPH-AR diseñados por el Laboratorio de Genética Molecular de Enfermedades Infecciosas y Cáncer de la Universidad Industrial de Santander (39). Se escogieron los fluoróforos y extintores recomendados por la casa comercial según los picos en el espectro de emisión, la intensidad de fluorescencia y los filtros ópticos utilizados por la máquina de qPCR. Las características de los cebadores específicos para los ORFs de E6/E7 de cada VPH-AR se observaron en la Figura 2. Los tamaños de los cebadores estuvieron referenciados en la Tabla 3.

Los datos obtenidos del instrumento de recolección de variables y de la qPCR serán diligenciados en el archivo de recolección de variables (Apéndice B), para su posterior análisis e interpretación estadística.

Tabla 3*Tamaño de cebadores*

| Genotipo | Pares de bases (pb) |
|-----------------|----------------------------|
| VPH-16 | 70 |
| VPH-31 | 69 |
| VPH-33 | 61 |
| VPH-52 | 146 |
| VPH-56 | 128 |
| VPH-58 | 195 |
| VPH-59 | 184 |

Nota. La tabla muestra el tamaño, expresado en pares de bases (pb), de los cebadores diseñados para los marcos de lectura abiertos (ORFs) E6/E7 correspondientes a cada genotipo del virus del papiloma humano (VPH).

8.1.8 Control de extracción de ADN

Se confirmó una correcta extracción de ADN y la ausencia de inhibidores de la PCR en las muestras, al amplificar un fragmento de 250 pb del gen de β -actina humana. Seguidamente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa, donde todas las muestras control fueron positivas para este gen.

Figura 2

Cebadores VPH-AR

| Nombre | Número de acceso en GenBank | Cebador | Secuencia (5'→3') | Tm °C | GC% | Longitud |
|--------|-----------------------------|---------|------------------------------|-------|-------|----------|
| VPH-16 | K02718 | Directo | ATGCACAAAAAGAGAACTGCAATGT | 40.00 | 62.19 | 776 |
| | | Inverso | TTATGGTTTCTGAGAACAGATGGGGC | 46.15 | 62.99 | |
| VPH-18 | GQ180792.1 | Directo | ATGGCGCGCTTTGAGGATCCA | 57.14 | 65.10 | 803 |
| | | Inverso | TTACTGCTGGGATGCACACCAC | 54.55 | 63.09 | |
| VPH-31 | J04353 | Directo | ATGTTCAAAAATCCTGCAGAAAGACC | 38.46 | 60.74 | 749 |
| | | Inverso | TTACAGTCTAGTAGAACAGTTGGGGC | 46.15 | 61.97 | |
| VPH-33 | M12732 | Directo | ATGTTCAAGACACTGAGGAAAACC | 38.46 | 60.41 | 758 |
| | | Inverso | TTATTGTTGTGCACAGGTAGGGCA | 45.83 | 62.81 | |
| VPH-35 | M74117 | Directo | ATGTTTCAGGACCCAGCTGAAC | 50.00 | 60.82 | 752 |
| | | Inverso | TTATGCTCTCTGTGAACAGCCG | 50.00 | 60.68 | |
| VPH-39 | M62849 | Directo | ATGGCGGATTTCACAATCCTG | 50.00 | 62.14 | 815 |
| | | Inverso | TTACTGGTTTGCAGTTGCACAC | 45.45 | 60.16 | |
| VPH-45 | X74479 | Directo | ATGGCGCGCTTTGACGAT | 55.56 | 60.82 | 806 |
| | | Inverso | TTATTGGTTAGTTGCACACCACGG | 45.83 | 61.81 | |
| VPH-51 | NC_001533.1 | Directo | ATGTTCGAAGACAAGAGGGAAAAGAC | 44.00 | 61.03 | 769 |
| | | Inverso | CTAGTTGTTGCACAACACGG | 52.38 | 60.07 | |
| VPH-52 | LC373207.1 | Directo | ATGTTGAGGATCCAGCAACACG | 47.83 | 61.67 | 751 |
| | | Inverso | TTATAGCCGTGCACAGCCGG | 60.00 | 62.92 | |
| VPH-56 | KX514418.1 | Directo | ATGGAGCCACAATTCAACAATCCA | 41.67 | 61.30 | 788 |
| | | Inverso | TTAGTTACTTGATGCGCAGAGTGG | 45.83 | 61.15 | |
| VPH-58 | KY225967.1 | Directo | ATGTTCCAGGACGCAGAGGAGA | 54.55 | 63.14 | 761 |
| | | Inverso | TTATTGCTGTGCACAGCTAGGGC | 52.17 | 63.60 | |
| VPH-59 | KC470266.1 | Directo | ATGGCACGCTTTGAGGATCTAC | 52.17 | 62.86 | 811 |
| | | Inverso | TTACTGGTTTGTGCACAAAAGG | 45.83 | 62.46 | |
| VPH-68 | KX514431.1 | Directo | TCACAACCCTGAGGAACGGC | 60.00 | 62.39 | 805 |
| | | Inverso | TTACTGGGTTCCGTTGCACACC | 52.17 | 63.66 | |
| VPH-73 | X94165 | Directo | ATGCTGTTCCCAATTGAGAAGAAC | 40.00 | 60.28 | 742 |
| | | Inverso | TTATAGGTTTCTGGAACAGTTGGGGC | 46.15 | 62.94 | |
| VPH-82 | AB027021 | Directo | ATGTTGAAGACATAAGAGAAAAGACCAC | 37.71 | 60.06 | 766 |
| | | | TTAGTTGGTCGGCACACCACGG | 57.14 | 63.15 | |

Nota. Tm °C: temperatura de fusión de los cebadores. GC%: porcentaje de contenido de guanina-citosina.

8.2. Análisis estadístico

8.2.1 Análisis univariado

Las variables que fueron recolectadas se evaluaron según su nivel de medición (medias o medianas para las variables continuas, con medidas de dispersión como la desviación estándar para variables de distribución normal y mediana y recorrido para las de distribución no normal; las variables categóricas se analizaron mediante proporciones). Se realizó el reporte de los respectivos intervalos de confianza del 95%.

8.2.2 Análisis bivariado

Para determinar la relación entre cada una de las variables independientes y la presencia de variables de desenlace, como la carga viral de VPH y el diagnóstico histopatológico, se realizó un análisis bivariado mediante regresión logística, lo que permitió calcular medidas de efecto, como el odds ratio (OR).

Se realizó un análisis de especificidad y sensibilidad de la prueba con un intervalo de confianza del 95%, utilizando, para mostrar la certeza diagnóstica, el valor predictivo positivo (VPP), el valor predictivo negativo (VPN), el likelihood ratio positivo (LRP), el likelihood ratio negativo (LRN) y el área bajo la curva (AUC). El nivel de certeza diagnóstica de la qPCR para el oncogén E7 se comparó con la lectura manual del patólogo experto mediante el índice de Kappa.

9. Consideraciones éticas

Este se clasificó como un estudio “sin riesgo”, de acuerdo con el literal “A” del artículo 11 de la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia y con la Declaración de Helsinki, ya que no se realizó ninguna intervención ni modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos. Así mismo, pudo ser amparado por el parágrafo primero del artículo 16 de la Resolución 8430 de 1993 para dispensar al investigador de la obtención de consentimiento informado.

Debido a que se incluyeron datos sensibles según el artículo 5 de la Ley 1581 de 2012, se trabajó con la base de datos anonimizada entregada por la Liga Santandereana Contra el Cáncer, confirmándose la existencia del consentimiento informado realizado por dicha institución, el cual permitió el tratamiento de las variables clínicas y sociodemográficas de las pacientes para estudios médico-científicos sin posibilidad de identificación.

El presente trabajo de investigación se rigió por los principios éticos de:

1. Beneficencia: Los investigadores protegieron y resguardaron los bloques de parafina, anonimizando los datos personales asociados a los mismos. El objetivo del estudio fue contribuir a la mejora de los beneficios potenciales de los métodos diagnósticos aplicables a la población en general.
2. No maleficencia: La investigación no confirió riesgo adicional, dado que no se realizó ninguna intervención sobre los pacientes implicados, ya que únicamente se trabajó con bloques de parafina entregados por la Liga Santandereana Contra el Cáncer.
3. Justicia: Los investigadores aseguraron que los bloques de parafina seleccionados para la realización del estudio contarán con todas las características técnicas

necesarias, de tal forma que se garantizara la reducción de sesgos sistemáticos que pudieran impedir la determinación del verdadero rendimiento de la prueba.

4. Autonomía: Se respetó el derecho a la autonomía al mantener la anonimización de los datos personales previamente asociados a los bloques de parafina.
5. Respeto: Se estableció el principio de respeto mediante una socialización prudente del impacto de los resultados de las pruebas y de su real aplicación.

10. Tratamiento de datos personales

Se respetaron los principios para el tratamiento de datos personales consignados en el artículo 4 de la misma ley, dado que solo se trabajó con las muestras anonimizadas entregadas por la Liga Santandereana Contra el Cáncer, quienes salvaguardaron los datos personales.

En relación con el artículo 5 de la Ley 1581 de 2012, se utilizaron únicamente los datos sensibles entregados por la Liga Santandereana Contra el Cáncer y que tuvieron relación con las variables previamente aceptadas.

El tratamiento de estos datos sociodemográficos, clínicos y hallazgos microscópicos tuvo exclusivamente finalidades estadísticas, académicas y científicas, dada la supresión de la identidad de los sujetos (titulares).

La información obtenida dentro de la investigación fue salvaguardada por el investigador principal en un disco duro externo, el cual se mantendrá bajo llave por el investigador principal por un tiempo máximo de tres años, posterior al cual será destruido.

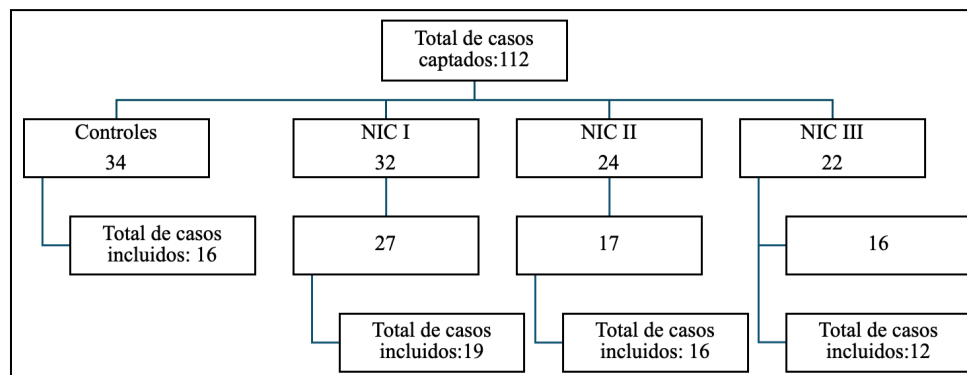
11. Resultados

11.1 Análisis univariado

Se realizó captación de 112 casos suministrados por la Liga Santandereana Contra el Cáncer con datos sensibles cegados, a los cuales se les aplicó la lista de criterios de inclusión y exclusión (Apéndice A) de los cuales 36 casos fueron rechazados en primera instancia por no cumplir con los criterios, posterior a este proceso 13 casos fueron rechazados por aspectos técnicos (Figura 3).

Figura 3

Cantidad de muestras recolectadas



Nota. Flujo de selección muestral desde 112 casos iniciales hasta los grupos finales (controles, NIC I, NIC II y NIC III) tras exclusiones por criterios clínicos y aspectos técnicos.

En el análisis univariado de los 63 casos incluidos en el estudio, la muestra estudiada presentó una edad promedio de $37,1 \pm 12,3$ años, con un rango entre 18 y 71 años (Tabla 4). El lugar de residencia de la mayoría de los casos fue Bucaramanga (66,7%, n=42), seguida de Piedecuesta (11,1%, n=7), Girón (6,3%, n=4) y Floridablanca (6,3%, n=4). Otros municipios, como Lebrija, Puerto Wilches, Ocaña, El Carmen de Chucurí y Suratá, aportaron un número menor de casos.

Tabla 4

Medidas estadísticas edad

| Medida estadística | Valor |
|---------------------------|--------------|
| Muestra (n) | 63 |
| Promedio | 37,1 |
| Edad mínima | 18 |
| Edad máxima | 71 |
| Desviación estándar | 12,2 |

Nota. La tabla presenta las medidas estadísticas descriptivas de la edad de los participantes del estudio.

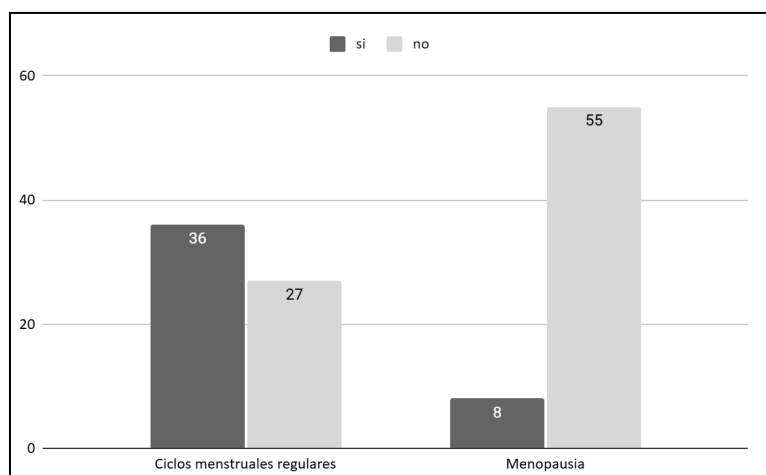
En cuanto a los antecedentes gineco-obstétricos, el número de gestas presentó una mediana de 1, con valores que oscilaron entre 0 y 9 gestas en la población estudiada. En relación

con los partos, la mediana fue de 1, con un rango entre 0 y 7 partos, mientras que los abortos mostraron valores entre 0 y 4. Ninguno de los participantes se encontraba en embarazo.

El 87,3% (n=55) de los participantes no se encontraba en menopausia, mientras que el 12,7% (n=8) sí lo estaba. Por otra parte, los ciclos menstruales regulares fueron reportados por 57,1% (n=36) de las mujeres, mientras que el 42,9% (n=27) indicó irregularidad menstrual (Figura 4).

Figura 4

Datos ginecológicos



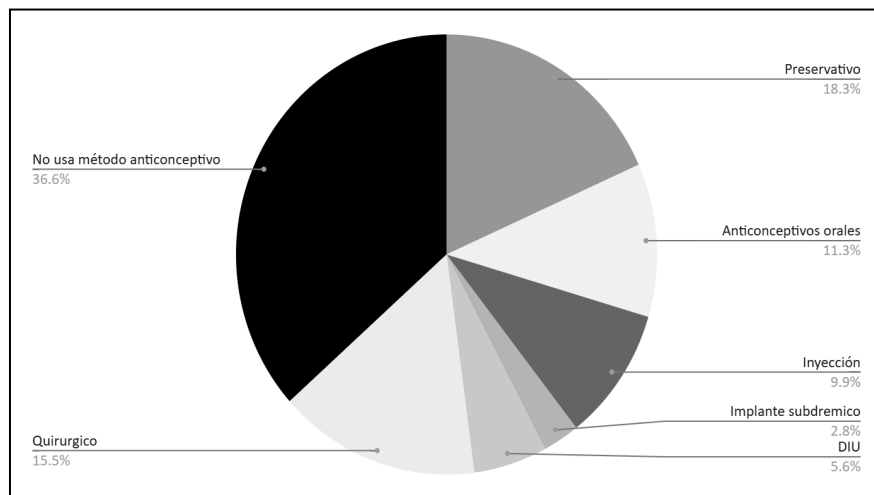
Nota. Distribución de características ginecológicas de la muestra según regularidad de ciclos menstruales y estado menopáusico.

La edad de inicio de relaciones sexuales (IRS) tuvo una media de 17 años. Finalmente, el 58,7% (n=37) de las participantes reportó usar métodos anticonceptivos, frente al 41,3% (n=26) que refirió no utilizarlos. El método anticonceptivo más utilizado fue el preservativo, empleado

por el 18,3% de las mujeres del estudio. El 12,7% de las mujeres utilizaban más de un método anticonceptivo (Figura 5).

Figura 5

Uso de métodos anticonceptivos



Con respecto a los resultados de citología, cabe resaltar que en el centro hacen distinción entre LIE-AG (NIC 2) y LIE-AG (NIC 3). Los hallazgos citológicos más frecuentes correspondieron a lesiones de bajo grado, las lesiones de alto grado (incluyendo LIE-AG y ASC-H) también estuvieron presentes en una proporción relevante de los casos (Tabla 5).

En los resultados de las biopsias, el diagnóstico más frecuente fue NIC 1, seguido por las categorías NIC 2 y biopsia negativa. La categoría NIC 3 se observó en 19% de los casos (Tabla 6).

Tabla 5*Resultados citología*

| Resultado de citología | Frecuencia | % |
|-----------------------------------|-------------------|------------|
| Citología normal | 1 | 1,5 |
| ASC-US | 14 | 22,2 |
| LIE-BG (NIC 1) | 26 | 41,7 |
| LIE-AG (NIC 2) | 10 | 15,6 |
| LIE-AG (NIC 3) | 2 | 3,2 |
| ASC-H | 3 | 4,7 |
| ACG | 7 | 11,1 |
| TOTAL | 63 | 100 |

Tabla 6*Resultados biopsia*

| Resultado de biopsia | Frecuencia | % |
|---------------------------------|-------------------|----------|
| Negativo (control) | 16 | 25,4 |

| Resultado de | Frecuencia | % |
|---------------------|-------------------|------------|
| biopsia | | |
| NIC 1 | 19 | 30,2 |
| NIC 2 | 16 | 25,4 |
| NIC 3 | 12 | 19 |
| TOTAL | 63 | 100 |

11.2 Análisis bivariado

Para el análisis bivariado, las variables cuantitativas se compararon mediante la prueba de Kruskal–Wallis, y las variables categóricas mediante la prueba de chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher, según correspondiera. El objetivo fue demostrar si existe algún factor protector para presentar alteraciones en el resultado de la biopsia (NIC 1, NIC 2 o NIC 3). En las variables numéricas no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en los valores promedio entre los grupos con biopsia negativa y biopsia alterada. La edad, el número de gestas, partos y abortos, así como la edad de inicio de relaciones sexuales (IRS), presentaron medias similares entre ambos grupos, sin alcanzar significancia estadística en la prueba t para muestras independientes o un valor de $p > 0,05$ (Tabla 7).

Se realizó un análisis de concordancia entre el resultado de citologías y el resultado de biopsia utilizando las equivalencias representadas en la Tabla 9, adicionalmente, las categorías de

LIE-AG (NIC 2) y LIE-AG (NIC 3) en citología se tomaron únicamente como LIE-AG. El análisis de concordancia se representa en la Tabla 10. El análisis de concordancia entre los resultados citológicos y los hallazgos histopatológicos se realizó mediante la proporción de acuerdo observado, a partir de equivalencias diagnósticas clínicas previamente definidas. Dado que las categorías citológicas no presentan una correspondencia directa uno a uno con las categorías histológicas, y que algunas categorías pueden corresponder a más de un grado de lesión en la biopsia, no se consideró apropiado el uso del índice Kappa de Cohen.

Tabla 7

Asociación de variables cuantitativas con resultado de biopsia alterada

| Variable | Media ± DE biopsia negativa | Media ± DE biopsia alterada | p |
|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|----------|
| Edad | 38,00 ± 12,01 | 34,89 ± 12,84 | 0,23 |
| Edad IRS | 16,90 ± 2,39 | 17,42 ± 3,00 | 0,92 |
| Gestas | 2,06 ± 2,06 | 1,57 ± 1,70 | 0,40 |
| Partos | 1,75 ± 1,74 | 1,31 ± 1,56 | 0,33 |
| Abortos | 0,31 ± 0,56 | 0,26 ± 0,65 | 0,43 |

Tabla 8*Asociación de variables dicotómicas con resultado de biopsia alterada*

| Variable | No usa | | Sí usa | | p |
|------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------|
| | Biopsia negativa | Biopsia alterada | Biopsia negativa | Biopsia alterada | |
| Ciclos | | | | | |
| menstruales | | | | | |
| regulares | 7 | 20 | 9 | 27 | 1 |
| Menopausia | 13 | 42 | 3 | 5 | 0,40 |
| Método | | | | | |
| anticonceptivo | 6 | 20 | 10 | 27 | 0,77 |
| Usa | | | | | |
| preservativo | 13 | 37 | 3 | 10 | 1 |
| Anticonceptivos | | | | | |
| orales | 12 | 43 | 4 | 4 | 0,18 |
| Inyección | 13 | 43 | 3 | 4 | 0,35 |
| Implante | | | | | |
| subdérmico | 16 | 45 | 0 | 2 | 1 |
| DIU | 15 | 44 | 1 | 3 | 1 |
| Quirúrgico | 15 | 37 | 1 | 10 | 0,26 |

Tabla 9*Categorías concordantes entre citología y biopsia*

| Categoría citología | Biopsia esperada (para ser concordante) |
|-----------------------------------|--|
| ASC-H | NIC 2 o NIC 3 |
| ASC-US | Negativa o NIC 1 |
| Citología normal | Negativa |
| LIE-BG (NIC 1) | NIC 1 |
| LIE-AG NIC 2 / NIC 3 (combinadas) | NIC 2 o NIC 3 |
| ACG | Categoría no equivalente |

En el proceso de construcción de la tabla 2×2 utilizada para evaluar el desempeño diagnóstico de la citología frente a la biopsia, no fue posible incluir la totalidad de los 63 casos iniciales. Esto se debe a que algunas categorías citológicas, particularmente ACG (atipias de células glandulares), no poseen una correspondencia diagnóstica directa con los diagnósticos de NIC 1, NIC 2 o NIC 3, por lo que no pueden clasificarse como “citología positiva” o “citología negativa” en un modelo dicotómico. En consecuencia, estos siete casos (ACG) fueron excluidos del análisis de desempeño, aunque sí se consideraron en la evaluación de concordancia general.

Adicionalmente, cuatro casos adicionales presentaban combinaciones diagnósticas que no podían ubicarse de manera consistente dentro de los criterios epidemiológicos de dicotomización necesarios para la construcción de la matriz diagnóstico-referencia. Por estas razones, el análisis 2×2 se realizó con un total de 52 casos (Tabla 11), correspondiente al subconjunto de datos que cumplía simultáneamente los criterios para su clasificación dicotómica tanto en citología (positiva vs negativa) como en biopsia (positiva vs negativa), siguiendo las recomendaciones metodológicas para estudios de validez diagnóstica.

Tabla 10

Análisis de concordancia citología y biopsia

| Categoría Citología | Biopsia | | | Total Casos | Concordancia | |
|---------------------|-----------------|----------------------|----------------------|----------------|--------------|----------------------|
| | Negativa (n) | Biopsia NIC 1 (n) | Biopsia NIC 2 (n) | | | Biopsia NIC 3 (n) |
| ACG | 4 | 0 | 0 | 3 | 7 | N/A |
| ASC-H | 1 | 0 | 2 | 0 | 3 | 66,70% |
| ASC-US | 7 | 3 | 2 | 2 | 14 | 71,40% |
| Citología Normal | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 100,00% |
| LIE-AG (NIC 2) | 1 | 0 | 7 | 2 | 10 | 90,00% |
| LIE-AG (NIC 3) | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 100,00% |
| LIE-BG (NIC 1) | 2 | 16 | 4 | 4 | 26 | 61,50% |
| TOTAL | 16 | 19 | 16 | 12 | 63 | 63,50% |

Tabla 11*Desempeño diagnóstico citología frente a biopsia*

| | Biopsia positiva | Biopsia negativa | Total |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------|
| Citología positiva | 32 (TP) | 8 (FP) | 40 |
| Citología negativa | 4 (FN) | 8 (TN) | 12 |
| Total | 36 | 16 | 52 |

11.3 Resultados qPCR

A las 63 muestras se les realizó un primer proceso de desparafinado y de extracción de ADN y ARN con el fin de determinar la presencia y la calidad del material genético en cada una de estas, seguida de una identificación de genotipo mediante PCR multiplex para amplificar la región del gen L1 (usando ADN viral); una vez identificado el genotipo, se ejecutó la PCR cuantitativa para el gen E7 (usando ARN viral) con cebadores dirigidos específicamente para este mismo.

Al realizar la prueba de genotipificación se encontró un 27,0% (n=17) de resultados positivos y un 73,0% (n=46) de resultados negativos. Entre las muestras con PCR positiva, se

identificaron ocho genotipos de VPH de alto riesgo, siendo el más frecuente el genotipo 16 (presente en el 58,8% de los casos positivos) como se puede visualizar en la Tabla 12.

Tabla 12

Distribución de genotipos de VPH

| Genotipo | n positivo (63) | % total | n entre PCR+ (n=17) | % entre PCR+ |
|-----------------|------------------------|----------------|--------------------------------|-------------------------|
| VPH 16 | 10 | 15,9 | 10 | 58,8 |
| VPH 31 | 3 | 4,8 | 3 | 17,6 |
| VPH 33 | 2 | 3,2 | 2 | 11,8 |
| VPH 39 | 1 | 1,6 | 1 | 5,9 |
| VPH 52 | 2 | 3,2 | 2 | 11,8 |
| VPH 56 | 1 | 1,6 | 1 | 5,9 |
| VPH 58 | 1 | 1,6 | 1 | 5,9 |
| VPH 59 | 2 | 3,2 | 2 | 11,8 |

La cuantificación viral se realizó sólo cuando la muestra tenía genotipo detectable en la PCR previa. La Tabla 13 resume la caracterización de la carga viral (detectada en 48 ng de ARN por UL) por genotipo y de la carga viral total (suma de todas las cargas detectadas por caso). A su

vez se realizaron controles positivos para todos los genotipos dando resultados de carga viral mínima de 4510 y máximos de 11700, también se realizaron controles negativos (No Template Control) con resultados de carga viral nula.

La carga viral detectable se concentró casi exclusivamente en los genotipos 16, 31 y 33, siendo VPH16 el de mayor expresión cuantitativa (Figuras 6, 7 y 8).

Tabla 13

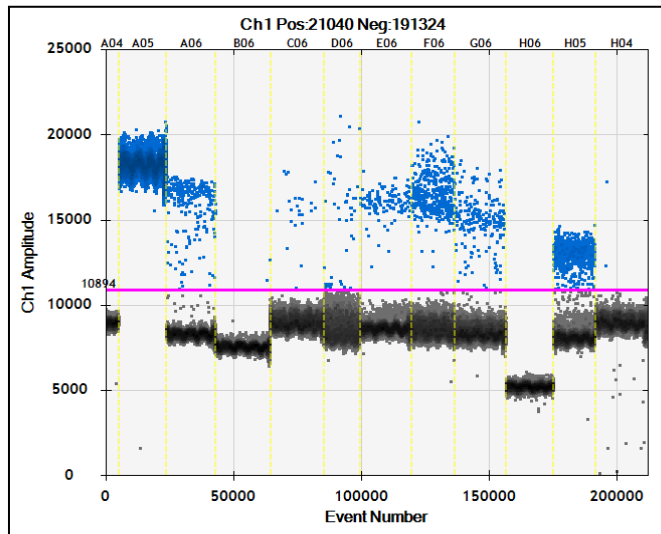
Carga viral mínima y máxima para cada genotipo detectada en 48 ng de ARN por UL

| Variable | (n) carga >0 | % sobre Total de casos (63) | Mediana (>0) | RIC (>0) | Máx |
|-----------------|----------------------------|--|----------------------------|--------------------|------------|
| Carga VPH16 | 9 | 14,3 | 7,90 | 1,35 – 17,5 | 77,9 |
| Carga VPH31 | 1 | 1,6 | 0,07 | 0,07 – 0,07 | 0,07 |
| Carga VPH33 | 1 | 1,6 | 1,21 | 1,21 – 1,21 | 1,21 |
| Carga VPH39 | 0 | 0 | - | - | 0 |
| Carga VPH52 | 0 | 0 | - | - | 0 |
| Carga VPH56 | 0 | 0 | - | - | 0 |
| Carga VPH58 | 0 | 0 | - | - | 0 |

| Variable | (n) carga >0 | % sobre Total de casos (63) | Mediana (>0) | RIC (>0) | Máx |
|-----------------|----------------------------|--|----------------------------|--------------------|------------|
| Carga VPH59 | 0 | 0 | - | - | 0 |

Nota. Caracterización de la carga viral (mediana, rango intercuartílico y valor máximo) para cada genotipo de VPH con detección previa por PCR. La cuantificación se realizó sobre 48 ng de ARN/ μ L; se incluyeron controles positivos y negativos para verificación del ensayo.

Al evaluar la relación entre el diagnóstico histopatológico y el resultado de la PCR para la detección del gen E7 del VPH de alto riesgo, se observó una distribución diferencial marcada entre las categorías diagnósticas. Mientras que las muestras negativas y las lesiones de bajo grado (NIC1) presentaron una baja proporción de resultados positivos por PCR, las lesiones de alto grado particularmente NIC3 mostraron una positividad significativamente más elevada. En específico, únicamente el 25% de las muestras negativas y el 5,3% de las NIC1 fueron positivas por PCR, en contraste con el 18,8 % de las NIC2 y el 75% de las NIC3. Este patrón se confirmó mediante la prueba de chi-cuadrado, que evidenció una asociación estadísticamente significativa entre el grado de lesión y la positividad molecular ($\chi^2 = 19,17$; $p = 0,00025$). Estos hallazgos sugieren un incremento progresivo de la detección de la expresión transcripcional de E7 conforme aumenta la severidad histológica, particularmente hacia las lesiones NIC3.

Figura 6*Resultados carga viral VPH-16*

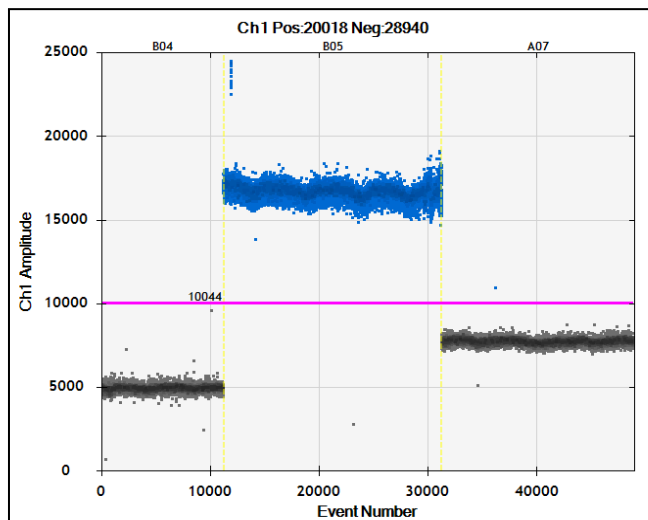
Nota. Gráfico de dispersión de PCR digital para VPH16. El eje X representa el número de eventos (gotas analizadas), mientras que el eje Y muestra la amplitud de fluorescencia del canal 1 (Ch1). Los puntos por encima del umbral de fluorescencia corresponden a eventos positivos para el blanco viral, y los situados por debajo, a eventos negativos.

Al evaluar la relación entre el diagnóstico histopatológico y el resultado de la PCR para la detección del gen E7 del VPH de alto riesgo, se observó una distribución diferencial marcada entre las categorías diagnósticas. Mientras que las muestras negativas y las lesiones de bajo grado (NIC1) presentaron una baja proporción de resultados positivos por PCR, las lesiones de alto grado particularmente NIC3 mostraron una positividad significativamente más elevada. En específico, únicamente el 25% de las muestras negativas y el 5,3% de las NIC1 fueron positivas por PCR, en contraste con el 18,8 % de las NIC2 y el 75% de las NIC3. Este patrón se confirmó mediante la prueba de chi-cuadrado, que evidenció una asociación estadísticamente significativa

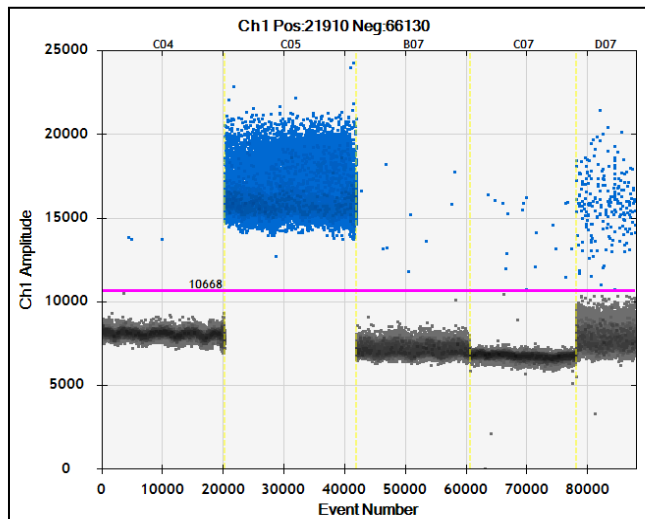
entre el grado de lesión y la positividad molecular ($\chi^2 = 19,17$; $p = 0,00025$). Estos hallazgos sugieren un incremento progresivo de la detección de la expresión transcripcional de E7 conforme aumenta la severidad histológica, particularmente hacia las lesiones NIC3.

Figura 7

Resultados carga viral VPH-31



Nota. Gráfico de dispersión de PCR digital para VPH31. El eje X representa el número de eventos (gotas analizadas), mientras que el eje Y muestra la amplitud de fluorescencia del canal 1 (Ch1). Los puntos por encima del umbral de fluorescencia corresponden a eventos positivos para el blanco viral, y los situados por debajo, a eventos negativos.

Figura 8.*Resultados carga viral VPH-33*

Nota. Gráfico de dispersión de PCR digital para VPH33. El eje X representa el número de eventos (gotas analizadas), mientras que el eje Y muestra la amplitud de fluorescencia del canal 1 (Ch1). Los puntos por encima del umbral de fluorescencia corresponden a eventos positivos para el blanco viral, y los situados por debajo, a eventos negativos.

La distribución de los genotipos específicos de VPH también mostró una relación estrecha con el grado de la lesión. El VPH16 fue el genotipo predominante en las lesiones de alto grado, detectándose en el 88,9 % de las muestras con NIC3 (positivas para la PCR) y en el 66,7 % de las NIC2, mientras que estuvo ausente en las categorías negativa y NIC1. Otros genotipos como VPH31 y VPH33 se detectaron en frecuencias bajas y dispersas, sin un patrón claro (Tabla 14).

Tabla 14*Genotipos según categoría de biopsia*

| Genotipo | Biopsia | (n) resultados positivos | % dentro de categoría |
|-----------------|----------------|---------------------------------|------------------------------|
| VPH16 | NIC1 | 0 | 0 |
| | NIC2 | 2 | 66,7 |
| | NIC3 | 8 | 88,9 |
| | Negativa | 0 | 0 |
| VPH31 | NIC1 | 0 | 0 |
| | NIC2 | 0 | 0 |
| | NIC3 | 1 | 11,1 |
| | Negativa | 2 | 50 |
| VPH33 | NIC1 | 0 | 0 |
| | NIC2 | 0 | 0 |
| | NIC3 | 2 | 22,2 |
| | Negativa | 0 | 0 |

| Genotipo | Biopsia | (n) resultados positivos | % dentro de categoría |
|-----------------------|----------------|---------------------------------|------------------------------|
| VPH16 | NIC1 | 0 | 0 |
| | NIC2 | 2 | 66,7 |
| | NIC3 | 8 | 88,9 |
| VPH52/56/58/59 | Varias | Frecuencias bajas | - |

Nota. Distribución de genotipos específicos de VPH según categoría histológica de biopsia. Los porcentajes corresponden a la proporción de casos positivos para cada genotipo dentro de cada categoría diagnóstica.

La relación entre la carga viral total y el diagnóstico histológico también fue significativa. Las muestras negativas y NIC1 presentaron valores de carga viral prácticamente indetectables, mientras que algunos casos de NIC2 mostraron cargas discretas. En cambio, el grupo NIC3 exhibió de manera consistente valores más elevados de carga viral, con máximos que alcanzaron 77,9 copias totales. La prueba de Kruskal–Wallis mostró diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos diagnósticos ($H = 28,18$; $p = 3,34 \times 10^{-6}$), indicando que la carga viral se incrementa conforme aumenta el grado histológico de la lesión. De forma complementaria, el análisis basado en la presencia o ausencia de carga viral detectable reforzó esta tendencia: mientras que ninguna muestra negativa o NIC1 presentó carga detectable, dos casos de NIC2 (12,5 %) y ocho de NIC3 (66,7 %) mostraron valores medibles. La prueba de

chi-cuadrado confirmó nuevamente una asociación significativa entre la carga viral detectable y la presencia de lesiones de alto grado ($\chi^2 = 29,92$; $p = 1,43 \times 10^{-6}$).

Debido a la baja cantidad de eventos que se pueden analizar por carga viral solo se realizó el análisis bivariado de las características sociodemográficas y ginecoobstétricas en relación a la carga viral del VPH-16 (genotipo más recurrente) el cual se encuentra consignado en la Tabla 15, donde se puede observar que ninguna de estas variables presentó asociación significativa.

Tabla 15

Análisis de variables sociodemográficas y ginecoobstétricas contra carga viral de VPH-16

| Variable | rho | p | Interpretación |
|--------------------------|------------|----------|-----------------------|
| Edad | 0,158 | 0,546 | No hay asociación |
| Gestas | -0,016 | 0,951 | No hay asociación |
| Partos | 0,049 | 0,852 | No hay asociación |
| Abortos | -0,255 | 0,323 | No hay asociación |
| Edad_irs | 0,246 | 0,342 | No hay asociación |
| Método anticonceptivo | 0,019 | 0,942 | No hay asociación |

Al analizar el desempeño diagnóstico de la PCR cuantitativa para el gen E7 del VPH de alto riesgo frente al estándar histopatológico, se construyó una matriz 2×2 (Tabla 16)

considerando como “enfermedad” la presencia de cualquier lesión intraepitelial escamosa (NIC1, NIC2 o NIC3) y como “no enfermedad” las biopsias negativas. A partir de estos datos, la sensibilidad de la PCR fue de 27,7 % (IC 95 %: 15,6–42,6 %), mientras que la especificidad alcanzó el 75,0 % (IC 95 %: 47,6–92,7 %). El valor predictivo positivo fue de 76,5 % (IC 95 %: 50,1–93,2 %) y el valor predictivo negativo de 26,1 % (IC 95 %: 14,3–41,1 %). Estos resultados indican que la prueba presenta una baja sensibilidad para detectar la presencia de lesiones intraepiteliales (NIC1–3), pero una especificidad y un valor predictivo positivo moderados, por lo que su rendimiento actual es más consistente con una prueba de carácter confirmatorio que de tamizaje para la detección de enfermedad histológica en este grupo de pacientes.

Tabla 16

Matriz 2×2 de la PCR para VPH de alto riesgo frente al diagnóstico histopatológico

| | Biopsia con lesión (NIC 1, 2 y 3) | | Biopsia negativa | Total |
|---------------------|--|----|-------------------------|--------------|
| PCR positiva | 13 | 4 | | 17 |
| PCR negativa | 34 | 12 | | 46 |
| Total | 47 | 16 | | 63 |

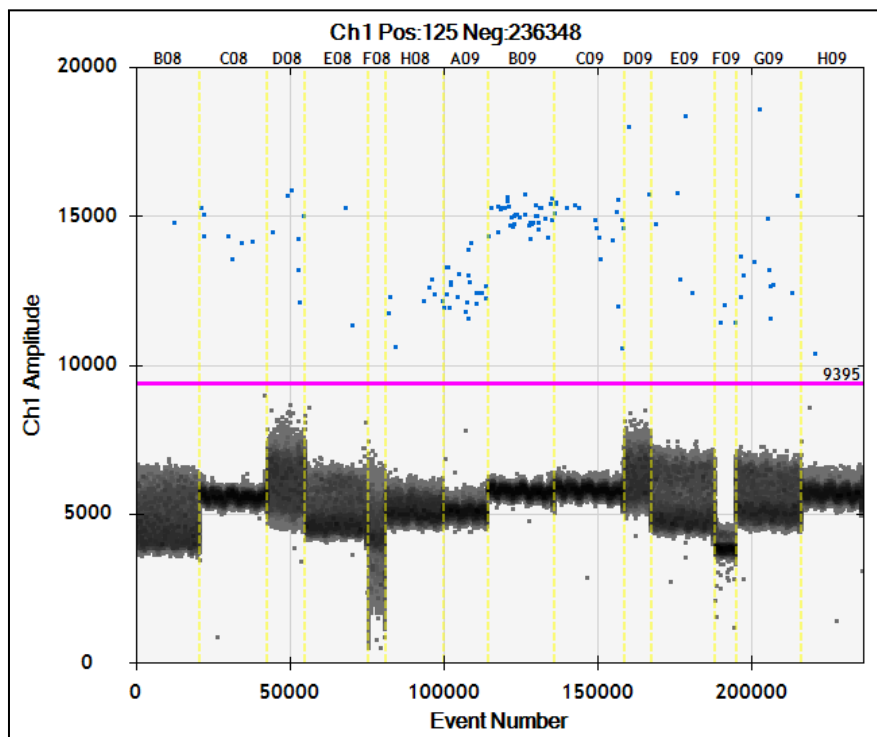
Sin embargo, debido a que la PCR se considera una prueba altamente sensible y específica, y en vista de la presencia de una gran proporción de falsos negativos, se realizaron

controles con un gen constitutivo de la mucosa cervical (RPP30) en las muestras con estos resultados (Figura 9), encontrando una expresión máxima de 2 transcritos por microlitro.

Debido a los hallazgos descritos se corrieron electroforesis para B-tubulina con el propósito de determinar la integridad del ADN y el ARN de las muestras (Figura 10), con el cual se demostró la degradación del ADN en algunas de las muestras analizadas y ausencia de ARN en la mayoría de los muestras.

Figura 9

Resultados transcritos RPP30

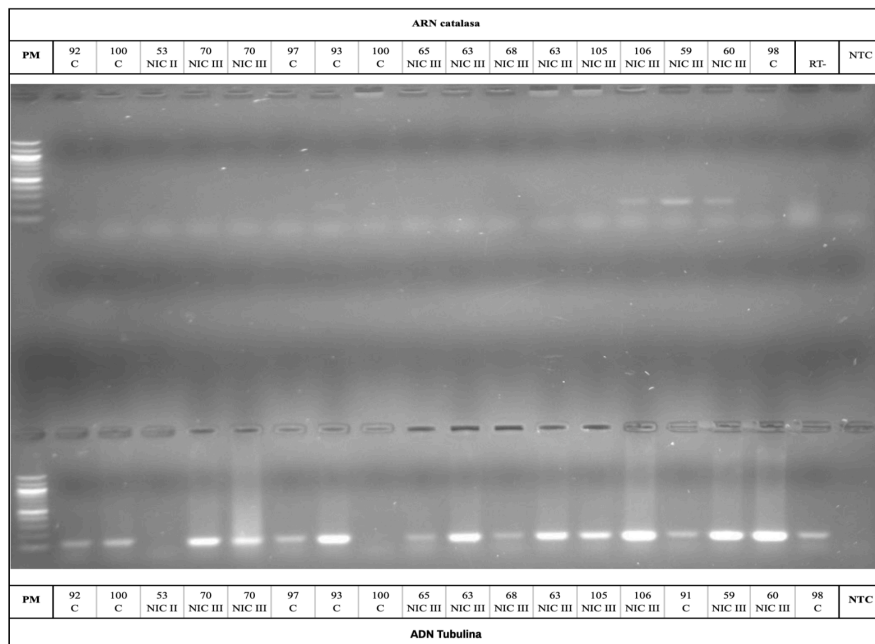


Nota. Gráfico de dispersión de PCR digital para RPP30. El eje X representa el número de eventos (gotas analizadas), mientras que el eje Y muestra la amplitud de fluorescencia del canal 1 (Ch1). Los puntos por encima del umbral de fluorescencia corresponden a eventos positivos para el blanco viral, y los situados por debajo, a eventos negativos.

A pesar de que el análisis de puntos de corte de carga viral con respecto al diagnóstico histopatológico hace parte de los objetivos del presente estudio y podría aportar información sobre la relación entre la cantidad de virus y la severidad histológica, no fue posible realizarlo de manera válida debido a limitaciones preanalíticas identificadas en las muestras. En consecuencia, se decidió no realizar el análisis de puntos de corte, debido a la alta probabilidad de generación de factores confusión y sesgos que propiciaron una mala interpretación de los resultados.

Figura 10

Resultados electroforesis para B-tubulina



Nota. Electroforesis del gen β -tubulina utilizada como control de integridad de ADN y ARN en las muestras analizadas. La presencia o ausencia de bandas permitió evidenciar degradación de ADN y escasa conservación de ARN en parte del material estudiado.

12. Discusión

El presente estudio evaluó el rendimiento de una qPCR dirigida al oncogén E7 del VPH de alto riesgo (VPH-AR) en biopsias de cérvix, analizando su concordancia con la citología y la histopatología, así como su relación con variables sociodemográficas, en el contexto de un programa de tamización del nororiente colombiano. Los hallazgos se interpretan a la luz de la literatura que reconoce el papel central de la expresión del gen E7 del VPH en la progresión de las lesiones cervicales, pero también las limitaciones técnicas de su detección en tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina. Los resultados obtenidos no solo permiten discutir el desempeño diagnóstico de las pruebas empleadas, sino que evidencian la influencia crítica de factores biológicos y especialmente, preanalíticos sobre el rendimiento de las técnicas moleculares en escenarios reales de práctica diagnóstica.

12.1 Rendimiento diagnóstico de la citología comparada con la biopsia

En este estudio, la citología convencional presentó una sensibilidad del 88,9% y una especificidad del 50% para detectar lesiones histológicas, en la literatura se ha descrito para la citología convencional cifras inferiores para sensibilidad (47–62%) y superiores para especificidad (60–95%), valores aumentan hasta una sensibilidad del 73,8% y una especificidad del 93,2% si se evalúa la citología en base líquida (43, 44). La variabilidad en el rendimiento del Papanicolaou es ampliamente reconocida y depende de factores como la adecuada obtención de la muestra, la experiencia del citotecnólogo y el contexto clínico de la población evaluada.

Adicionalmente, es necesario tener en cuenta que la muestra representa una porción muy pequeña de la cantidad de citologías captadas por el centro lo cual podría no reflejar la concordancia verdadera (43, 44).

La alta sensibilidad observada puede estar influenciada por la selección de una población con citología previa alterada, lo que incrementa la probabilidad pretest de detectar lesiones. La menor especificidad puede deberse a la alta frecuencia de reportes como ASC-US o LIE-BG, categorías que suelen asociarse con falsos positivos cuando se comparan con la biopsia (44).

La concordancia citología–biopsia del 63,5% observada en este estudio es comparable a la reportada en programas de tamización basados en citología convencional, reafirmando su utilidad en escenarios de tamizaje, aunque con limitaciones para la determinación del grado real de la lesión (45).

12.2 Desempeño de la qPCR dirigida al gen E7 del VPH

El rendimiento de la qPCR fue inferior al esperado en pruebas moleculares: sensibilidad del 27,7% y especificidad del 75%. Esto contrasta con estudios que reportan sensibilidades superiores al 90% para la detección de VPH de alto riesgo, particularmente cuando se analizan genes tempranos como E6/E7 o marcadores de transcripción viral (46).

La discrepancia con la literatura puede explicarse por factores preanalíticos críticos:

1. Degradación del ARN y del ADN: los controles internos (RPP30) mostraron niveles muy bajos de amplificación (<2 transcritos/ μ L) y la electroforesis de β -tubulina evidenció fragmentación del ADN y ausencia de ARN en la mayoría de las muestras.

La literatura es clara en que la preservación del ARN en tejidos fijados en formalina e impregnado en parafina (FFPE) es altamente vulnerable al tiempo prolongado de almacenamiento, altas temperaturas en procesos de inclusión en parafina, a métodos de fijación no estandarizados. La degradación del ARN afecta directamente la detección de transcritos virales como E7, generando falsos negativos en qPCR (47).

2. Pérdida del gen L1 en lesiones avanzadas: la genotipificación mediante ensayos dirigidos al gen L1 puede fallar en lesiones NIC2–3 debido a la integración del VPH al genoma celular, esto podría explicar la discordancia entre biopsias con NIC2–3 y pruebas moleculares negativas (9).

3. Longitud de amplicones: la eficiencia de amplificación disminuye en presencia de ARN fragmentado, especialmente cuando los amplicones son de mayor longitud. VPH16, que tuvo el amplicón más corto, fue también el genotipo con mayor detección, lo cual coincide con publicaciones previas (48).

En conjunto, estos elementos podrían confirmar que el bajo rendimiento de la qPCR no es reflejo de una falla del diseño molecular, sino de condiciones preanalíticas adversas.

12.3 Relación entre carga viral y severidad histológica

A pesar de las limitaciones, se observó que la detección de carga viral y la positividad de la qPCR aumentaron con la severidad histológica, siendo más frecuentes en NIC3. Esto concuerda con la evidencia de que la expresión de E7 incrementa a medida que el virus se integra y la lesión progresa (49).

Sin embargo, no fue posible establecer puntos de corte de carga viral por la escasa cantidad de casos con carga detectable por genotipo.

12.4 Asociación entre variables sociodemográficas, citología, biopsia y PCR

El análisis bivariado no mostró asociación significativa entre variables sociodemográficas (edad, gestas, partos, edad de inicio sexual, método anticonceptivo) y la presencia de lesión histológica, lo cual es coherente con estudios que señalan que la progresión a NIC2–3 depende más de la biología viral y la respuesta inmune que de características sociodemográficas por sí solas (50, 51).

Del mismo modo, la carga viral por genotipo no mostró relación significativa con ningún factor sociodemográfico, lo cual se explica por el pequeño número de casos con carga detectable y por la degradación del material.

Aunque inicialmente se contempló realizar regresión logística para evaluar la asociación entre factores sociodemográficos y carga viral, esto no fue metodológicamente viable debido al número reducido de casos con carga detectable por genotipo, lo cual contraría los criterios del modelo multivariado y a la degradación del material genético, que invalida la confiabilidad de las variables; lo cual podría conllevar a un alto riesgo de sobreajuste y falta de estabilidad del modelo (52).

12.5 Fortalezas del estudio

Este estudio integra de manera comparativa información citológica, histopatológica y molecular, lo que permitió evaluar el desempeño diagnóstico de la qPCR dirigida al oncogén E7

frente a los métodos convencionales. El análisis independiente por genotipo de VPH-AR reconoce la heterogeneidad biológica de la infección. Además, la inclusión de controles internos y la verificación de la integridad del material genético fortalecen la validez de los resultados al identificar de forma objetiva las limitaciones preanalíticas que influyeron en el rendimiento de la prueba.

12.6 Limitaciones y posibles sesgos

Este estudio presenta limitaciones que deben ser consideradas al interpretar los resultados. En primer lugar, el tamaño muestral fue limitado y la mayoría de los genotipos presentó un número reducido de casos con carga viral detectable, lo que restringió la posibilidad de realizar análisis multivariados robustos y de establecer puntos de corte de carga viral con utilidad clínica. En segundo lugar, el uso de muestras con degradación significativa del ADN y del ARN, pudo introducir un sesgo de clasificación hacia falsos negativos en la qPCR. Esta limitación preanalítica pudo subestimar el verdadero rendimiento de la técnica molecular.

Adicionalmente, la naturaleza transversal del estudio impide evaluar la dinámica temporal de la infección y su progresión, lo cual sería relevante para interpretar el significado clínico de la carga viral.

12.7 Implicaciones clínicas

Este estudio confirma que la citología, aunque útil como tamizaje, tiene limitaciones en especificidad y clasificación del grado de lesión (53). La qPCR dirigida a E7 tiene un potencial

significativo, especialmente para identificar lesiones de alto grado, pero requiere condiciones preanalíticas estrictas para garantizar la integridad del ARN (48).

13. Recomendaciones para futuros estudios

Los hallazgos de este estudio permiten identificar varias áreas de mejora para investigaciones futuras que evalúen la utilidad diagnóstica de la qPCR dirigida al oncogén E7 del VPH de alto riesgo. En primer lugar, se recomienda optimizar las condiciones preanalíticas de las muestras, incluyendo la fijación, preservación y almacenamiento del tejido, dado que la degradación del ARN y del ADN tuvo un impacto determinante en la sensibilidad de la técnica. El uso de muestras frescas o conservadas en medios que mantengan la estabilidad del ARN podría reducir la frecuencia de falsos negativos.

En segundo lugar, es necesario contar con tamaños de muestra más amplios, que permitan disponer de un número suficiente de casos con carga viral detectable por genotipo. Esto facilitaría la realización de análisis estadísticos más robustos, establecer posibles puntos de corte de carga viral y evaluar adecuadamente la relación entre variables sociodemográficas, características clínicas y progresión de la lesión.

Asimismo, futuros estudios deberían considerar la implementación de métodos moleculares alternativos o complementarios, como qPCR con cebadores más cortos con el fin de mejorar la sensibilidad de la prueba en muestras en las que no se pueda asegurar la integridad del tejido (material genético parcialmente degradado).

Finalmente, se sugiere impulsar estudios longitudinales y multiparamétricos que integren citología, histopatología y biomarcadores moleculares para profundizar en la dinámica de la infección y en los factores que determinan la progresión hacia lesiones de alto grado.

14. Conclusiones

Los resultados de este estudio evidencian que, aunque la qPCR dirigida al oncogén E7 del VPH de alto riesgo representa una herramienta con gran potencial diagnóstico, no es viable implementarla en las condiciones preanalíticas utilizadas, debido al impacto directo de la degradación del ARN y del ADN en su rendimiento. La baja sensibilidad observada no refleja una falla del diseño molecular, sino las limitaciones inherentes al procesamiento, preservación y almacenamiento de los tejidos, que comprometieron la detección de transcritos virales y generaron un número elevado de falsos negativos.

A pesar de ello, la tendencia de aumento en la positividad y en la detección de carga viral en las lesiones de mayor grado sugiere que, en condiciones óptimas, la qPCR orientada a E7 podría constituirse en un marcador útil para identificar lesiones de alto riesgo. Sin embargo, para alcanzar este desempeño se requiere material biológico adecuadamente preservado, protocolos estandarizados y métodos de extracción que garanticen la integridad de los ácidos nucleicos.

El estudio también confirma que la citología mantiene un rol fundamental como prueba de tamización; mientras que la biopsia sigue siendo el estándar para confirmar y categorizar las lesiones cervicales. La ausencia de asociaciones significativas entre variables sociodemográficas

y carga viral por genotipo resalta que la progresión del VPH depende principalmente de factores virales y moleculares más que de características demográficas.

En conjunto, estos hallazgos subrayan que la implementación de qPCR para VPH en tejidos FFPE requiere optimización preanalítica estricta y la posible adaptación de los métodos moleculares frente a la degradación del material. Hasta que estas condiciones no se cumplan, la prueba no puede considerarse un método confiable para uso diagnóstico o de investigación en este tipo de muestras.

15. Cronograma de actividades

Tabla 17

Cronograma de actividades marzo 2023 a septiembre 2024

| Actividad | Mar - Oct 2023 | Nov - Dic 2023 | Ene - Feb 2023 | Abr - Mar 2024 | Abr - May 2024 | Jun - Jul 2024 | Ago - Sep 2024 |
|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Elaboración protocolo | | | | | | | |
| Sustentación al claustro de profesores | | | | | | | |

| Actividad | Mar - Oct 2023 | Nov - Dic 2023 | Ene - Feb 2023 | Abr - Mar 2024 | Abr - May 2024 | Jun - Jul 2024 | Ago - Sep 2024 |
|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Sustentación y presentación al CEINCI - UIS | | | | | | | |
| Selección de casos para estudio | | | | | | | |
| Recolección de variables y biopsias | | | | | | | |
| Realización de qPCR por parte de Laboratorio de Virología del Parque Tecnológico de Guatiguará | | | | | | | |

Tabla 18*Cronograma de actividades octubre 2024 a noviembre 2025*

| Actividad | Oct - Nov 2024 | Dic 2024 | Ene - Feb 2025 | Mar - Abr 2025 | Jun - Jul 2025 | Ago - Sep 2025 | Oct - Nov 2025 |
|---|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Análisis de los resultados y Creación de artículo | | | | | | | |
| Publicación de resultados | | | | | | | |
| Presentación en eventos | | | | | | | |

16. Presupuesto

Figura 11

Presupuesto

Presupuesto global de la propuesta

NOMBRE PROPUESTA: Capacidad discriminativa del oncogén E7-VPH-AR en el diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) comparado con el diagnóstico histopatológico en biopsias de cérvix de un centro de referencia para tamizaje de cáncer de cuello uterino.

CONVOCATORIA: INVESTIGACIÓN BÁSICA

| Ítem | RUBRO | FINANCIACIÓN UIS 2023 | | FINANCIACIÓN UIS 2024 | | FINANCIACIÓN OTRA(S) INSTITUCIÓN(ES) 2023 | | FINANCIACIÓN OTRA(S) INSTITUCIÓN(ES) 2024 | | TOTAL |
|--------------|---------------------------------------|-----------------------|---------|-----------------------|----------------|---|---------|---|---------|----------------|
| | | Efectivo | Especie | Efectivo | Especie | Efectivo | Especie | Efectivo | Especie | |
| 1 | Honorarios | \$ - | \$ - | \$ - | \$ 94.350.000 | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ 94.350.000 |
| 2 | Auxiliares estudiantiles | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - |
| 3 | Riesgos laborales estudiantiles | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - |
| 4 | Servicios Técnicos | \$ - | \$ - | \$ - | \$ 1.300.000 | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ 1.300.000 |
| 5 | Pasajes | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - |
| 6 | Válidos | \$ - | \$ - | \$ 1.500.000 | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ 1.500.000 |
| 7 | Gastos de viaje | \$ - | \$ - | \$ 350.000 | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ 350.000 |
| 8 | Equipos de laboratorio | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - |
| 9 | Maquinaria | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - |
| 10 | Prácticas docentes y salidas de campo | \$ - | \$ - | \$ 4.500.000 | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ 4.500.000 |
| 11 | Reparación y mantenimiento | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - |
| 12 | Reactivos y materiales de laboratorio | \$ - | \$ - | \$ - | \$ 3.500.000 | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ 3.500.000 |
| 13 | Licencias de software | \$ - | \$ - | \$ - | \$ 1.200.000 | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ 1.200.000 |
| 14 | Papelaría y útiles de escritorio | \$ - | \$ - | \$ - | \$ 650.000 | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ 650.000 |
| 15 | Libros y material bibliográfico | \$ - | \$ - | \$ - | \$ 3.600.000 | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ 3.600.000 |
| 16 | Equipo audiovisual | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - |
| 17 | Equipo de oficina | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - |
| 18 | Equipo de cómputo | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - |
| 19 | Muebles y enseres | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - |
| 20 | Elementos de laboratorio | \$ - | \$ - | \$ - | \$ 1.500.000 | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ 1.500.000 |
| 21 | Herramientas | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - |
| 22 | Montaje e instalaciones | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - |
| 23 | Adecuaciones | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - |
| 24 | Arrendamientos | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - |
| 25 | Seguros | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - |
| 26 | Capacitación de personal | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - |
| 27 | Portes y fletes | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - |
| 28 | Acarreos | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - |
| 29 | Avisos e impresos | \$ - | \$ - | \$ - | \$ 150.000 | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ 150.000 |
| 30 | Servicios | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - |
| 31 | Gastos de importación | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - |
| TOTAL | | \$ - | \$ - | \$ 6.350.000 | \$ 106.150.000 | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ 112.500.000 |

Referencias bibliográficas

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* mayo de 2021;71(3):209–49.
2. Muñoz NBLE. Epidemiology of cervical cancer in Colombia. *Colomb Med.* 2012;43(4):298–304.
3. Hausen H Zur. The search for infectious causes of human cancers: Where and why (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie - International Edition.* el 27 de julio de 2009;48(32):5798–808.
4. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJF, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer.* el 15 de febrero de 2011;128(4):927–35.
5. Ministerio de Salud y Protección Social. Guía de Práctica Clínica para la detección y manejo de lesiones precancerosas de cuello uterino. Guía para profesionales. Colombia 2014.
6. Rincon R DF, Morales L LA, Rincón-Orozco B. Modernas metodologías diagnósticas para la detección del Virus del Papiloma Humano y prevención del cáncer de cuello uterino. *Revista de la Universidad Industrial de Santander Salud.* el 30 de septiembre de 2017;49(3):478–88.
7. López J, Aristizábal FA. Integración viral y cáncer de cuello uterino. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas.* 2006;35(1):5–32.

8. Peña López BO, Torrado García LM, Martínez Vega RA, Rincón-Orozco B. Prueba de concepto de una PCR multiplex de primera generación (cualitativa) para detección del oncogén E7 de VPH de alto riesgo. *Investigaciones Andina*. 2019;21(39):267–84.
9. Tjalma, W. A. A., and C. E. Depuydt. "Cervical cancer screening: which HPV test should be used L1 or E6/E7?." *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 170.1 (2013): 45-46.
10. McBride AA, Warburton A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. Vol. 13, PLoS Pathogens. Public Library of Science; 2017.
11. Dalstein V, Riethmuller D, Préteti JL, Le Bail Carval K, Sautière JL, Carbillet JP, et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: A longitudinal French cohort study. *Int J Cancer*. el 1 de septiembre de 2003;106(3):396–403.
12. Polanco EB, Águila Rodríguez N, Guerra Villarpanda D, Blanco Vázquez Y, Rodríguez González O, Santana MO, et al. Cáncer cérvico uterino: prevención y tratamiento Cervical uterine cancer: prevention and treatment [Internet]. Disponible en: <http://www.medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/4648>
13. Medina-Villaseñor EA, Oliver-Parra PA, Neyra-Ortiz E, Armando Pérez-Castro J, Raúl Sánchez-Orozco J, Contreras-González N. Neoplasia intraepitelial cervical, análisis de las características clínico-patológicas [Internet]. Vol. 13, *Gaceta Mexicana de Oncología*. 2014. Disponible en: www.elsevier.es
14. López Díez E, Pérez S, Iñarrea A, de la Orden A, Castro M, Almúster S, et al. Prevalencia y concordancia de infección por papilomavirus de alto riesgo en las parejas sexuales masculinas de

mujeres diagnosticadas de lesiones cervicales de alto grado. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* el 1 de mayo de 2017;35(5):273–7.

15. Kombe Kombe AJ, Li B, Zahid A, Mengist HM, Bounda GA, Zhou Y, et al. Epidemiology and Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases, Molecular Pathogenesis, and Vaccine Evaluation. Vol. 8, *Frontiers in Public Health*. Frontiers Media S.A.; 2021.
16. Berrington De González A, Green J. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: Collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. *Int J Cancer.* el 15 de febrero de 2007;120(4):885–91.
17. Yoo W, Kim S, Huh WK, Dilley S, Coughlin SS, Partridge EE, et al. Recent trends in racial and regional disparities in cervical cancer incidence and mortality in United States. *PLoS One.* el 1 de febrero de 2017;12(2).
18. Gierisch JM, Coeytaux RR, Urrutia RP, Havrilesky LJ, Moorman PG, Lowery WJ, et al. Oral contraceptive use and risk of breast, cervical, colorectal, and endometrial cancers: A systematic review. Vol. 22, *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2013. p. 1931–43.
19. Hemminki K, Chen B. Familial risks for cervical tumors in full and half siblings: Etiologic apportioning. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention.* julio de 2006;15(7):1413–4.
20. Harden ME, Munger K. Human papillomavirus molecular biology. Vol. 772, *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. Elsevier B.V.; 2017. p. 3–12.
21. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Vol. 324, *Virology*. 2004. p. 17–27.

22. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. Vol. 10, *The lancet oncology*. 2009. p. 321–2.
23. Pal A, Kundu R. Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. Vol. 10, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
24. Vallejo-Ruiz V, Velázquez-Márquez N, Sánchez-Alonso P, Santos-López G, Reyes-Leyva J. Temas de actualidad La oncoproteína E7 del virus de papiloma humano y su papel en la transformación celular Human papillomavirus E7 oncoprotein and its role in the cell transformation.
25. Ohlenschläger O, Seiboth T, Zengerling H, Briese L, Marchanka A, Ramachandran R, et al. Solution structure of the partially folded high-risk human papilloma virus 45 oncoprotein E7. *Oncogene*. el 28 de septiembre de 2006;25(44):5953–9.
26. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. Vol. 16, *Clinical Microbiology Reviews*. 2003. p. 1–17.
27. Partridge EE, Abu-Rustum NR, Campos SM, Fahey PJ, Farmer M, Garcia RL, et al. Cervical Cancer Screening NCCN [Internet]. 2010. Disponible en: www.NCCN.org.
28. Maver PJ, Poljak M. Primary HPV-based cervical cancer screening in Europe: implementation status, challenges, and future plans. Vol. 26, *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V.; 2020. p. 579–83.
29. Orden BEATRIZ LONDOÑO SOTO L, Lucía Ospina Martínez M, Julio Muñoz Muñoz N, LUBÍN BURGOS BERNAL Secretario General G, Gonzalo López Casas J. Vacunas al día, se la ponemos fácil Salud es prosperidad para todos 2 Ministerio de Salud y Protección Social República de Colombia.

30. García-López T, León-Hernández J, García-Perdomo H, Pacheco R. Evaluación de un programa de detección temprana de cáncer cervicouterino en Colombia. *Revista Colombiana de Cancerología*. julio de 2017;21(3):143–51.
31. Rivas-Perdomo EE. Biopsia de cérvix: serie de casos* Cervical biopsy: cases series. *Barranquilla (Col)*. 2013;29(2):259–60.
32. Amézquita M, Silva GC, Restrepo DA, Ibata LM, Niño R, Bustacara M, et al. Budget impact analysis of primary screening with the HPV test and genotyping against conventional cytology in Colombia. *Biomedica*. 2022;42(2):290–301.
33. Murillo R, Wiesner C, Cendales R, Piñeros M, Tovar S, en Enf L. Comprehensive evaluation of cervical cancer screening programs: the case of Colombia. Vol. 53, *Salud Publica Mex*. 2011.
34. Cuzick J, Sasieni P, Davies P, Adams J, Normand C, Frater A, et al. A systematic review of the role of human papilloma virus (HPV) testing within a cervical screening programme: Summary and conclusions. *Br J Cancer*. 2000;83(5):561–5.
35. Buck CB, Day PM, Trus BL. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*. octubre de 2013;445(1–2):169–74.
36. Torrado G LM, Rincón Orozco B, Martínez-Vega RA. Genotipificación del Virus de Papiloma Humano en mujeres de la comuna norte de Bucaramanga. *Revista de la Universidad Industrial de Santander Salud* [Internet]. el 20 de agosto de 2018;50(3):225–32. Disponible en: <https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistasaluduis/article/view/8526/8442>
37. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. Vol. 25, *Reviews in Medical Virology*. John Wiley and Sons Ltd; 2015. p. 2–23.

38. Villegas VE, Sánchez MC, Chuaire L. Reacción en cadena de la polimerasa y diagnóstico molecular. Vol. 40. Julio-Septiembre; 2009.
39. Peña-López BO, Martínez-Vega RA, Rincón-Orozco B. Estandarización de PCR en tiempo real para detección y cuantificación de los oncogenes E7 de seis Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo. Salud UIS [Internet]. el 6 de julio de 2023;55(1). Disponible en: <https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistasaluduis/article/view/12502>
40. Bodelon C, Vinokurova S, Sampson JN, den Boon JA, Walker JL, Horswill MA, et al. Chromosomal copy number alterations and HPV integration in cervical precancer and invasive cancer. *Carcinogenesis*. el 8 de septiembre de 2015;37(2):188–96.
41. Sample to Insight__ DNeasy ® Blood & Tissue Handbook. 2020.
42. Longmire J, Albright K, Lewis A, Meincke L, Hildebrand C, Leadon S, et al. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Vol. 15, *Nucleic Acids Research*. C I R L Press Limited; 1987.
43. Ronco, Guglielmo, et al. "Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials." *The lancet* 383.9916 (2014): 524-532.
44. Arbyn, Marc, et al. "Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis." *Obstetrics & Gynecology* 111.1 (2008): 167-177.
45. Elizabeth, Zamora-Julca Roxana, Ybaseta-Medina Jorge, and Palomino-Herencia Adrián. "Relación entre citología, biopsia y colposcopia en cáncer cérvico uterino." *Revista Médica Panacea* 8.1 (2019).

46. Derby, Awoke, et al. "HPV E6/E7 mRNA test for the detection of high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2+): a systematic review." *Infectious Agents and Cancer* 15.1 (2020): 9.
47. Kashofer, Karl, et al. "Quality control of RNA preservation and extraction from paraffin-embedded tissue: implications for RT-PCR and microarray analysis." *PLoS One* 8.7 (2013): e70714.
48. Moberg, Martin, Inger Gustavsson, and Ulf Gyllensten. "Real-time PCR-based system for simultaneous quantification of human papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer." *Journal of clinical microbiology* 41.7 (2003): 3221-3228.
49. Mirabello, Lisa, et al. "HPV16 E7 genetic conservation is critical to carcinogenesis." *Cell* 170.6 (2017): 1164-1174.
50. Adcock, Rachael, et al. "Role of HPV genotype, multiple infections, and viral load on the risk of high-grade cervical neoplasia." *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 28.11 (2019): 1816-1824.
51. Wiley, Dorothy J., et al. "Behavioral and sociodemographic risk factors for serological and DNA evidence of HPV6, 11, 16, 18 infections." *Cancer Epidemiology* 36.3 (2012): e183-e189.
52. Zabor, Emily C., et al. "Logistic regression in clinical studies." *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 112.2 (2022): 271-277.
53. World Health Organization. *WHO guidelines for screening and treatment of precancerous lesions for cervical cancer prevention*. World Health Organization, 2021.
54. Clavel, C., Rihet, S., Masure, M., Chypre, C., Boulanger, J. C., Quereux, C., & Birembaut, P. (1998). DNA-EIA to detect high and low risk HPV genotypes in cervical lesions with E6/E7 primer mediated multiplex PCR. *Journal of clinical pathology*, 51(1), 38-43.



Apéndice A.

Lista de chequeo criterios de inclusión y exclusión

Código de muestra: _____

| Ítem | Elementos | Sí | No | Observaciones |
|-------------------------------|--|----|----|---------------|
| Criterios de inclusión | | | | |
| 1 | Biopsia de cérvix embebidas en parafina del paciente, quién es mayor de 18 años, con reporte de citología previa que reportó anomalías de las células epiteliales. | | | |
| 2 | El resultado histopatológico de la biopsia de cérvix es NIC 1, 2, 3 o Carcinoma <i>in situ</i> . | | | |
| Criterios de exclusión | | | | |
| 1 | Es una biopsia de cérvix de una paciente con antecedente de conización. | | | |
| 2 | Las biopsias de cérvix han estado almacenadas por más de 10 años (contabilizado desde febrero de 2024). | | | |
| 3 | Los bloques de parafina se encuentran deteriorados (no cumplen con criterios de almacenamiento, presentan abolladuras, ralladuras y otros criterios que el investigador principal crea pertinentes). | | | |
| 4 | ¿El participante ha tenido antecedente de conización previo a la toma de las Biopsias? | | | |

| Lista de chequeo verificada por el investigador principal | |
|---|--------|
| Firma: | Fecha: |



Apéndice B.

Instrumento para la recolección de variables

Código de la muestra: _____

INFORMACIÓN GENERAL DEL PARTICIPANTE INFORMACIÓN GENERAL DEL PARTICIPANTE

| | |
|---|----------------------|
| Código de identificación de la muestra: | |
| Edad: | Lugar de residencia: |

ANTECEDENTES INFORMACIÓN GENERAL DEL PARTICIPANTE

| | |
|---|----------------------|
| Edad de inicio de vida sexual: | Uso de preservativo: |
| Número de compañeros sexuales en el último año: Uso de método anticonceptivo: | |
| Uso de método anticonceptivo: | |

RESULTADOS DE LABORATORIO INFORMACIÓN GENERAL DEL PARTICIPANTE

| | |
|--------------------------------|---------------|
| Resultado de citología previa: | |
| Resultado de biopsia: | |
| Carga viral VPH según qPCR: | Validado por: |