

11261 /



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INFECCION POR VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN  
MUJERES MEXICANAS SANAS, CON LESION  
PREMALIGNA Y MALIGNA DEL CERVIX

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
AREA BIOQUIMICA**

PRESENTA:

**BIOL. ADELA LUCIA CARRILLO GARCIA**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARCELA LIZANO SOBERON

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F.

2002



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo fue realizado en la Subdirección de investigación básica del Instituto Nacional de Cancerología, bajo la dirección de la Dra. Marcela Lizano Soberón.

La tesis fue aceptada como requisito para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biomédicas (área Bioquímica), por el siguiente jurado:

Presidente: Dr. Alejandro García Carrancá

Secretario: Dr. Mauricio Salcedo Vargas

Primer vocal: Dra. Marcela Lizano Soberón

Suplente: Dr. Alfonso Dueñas González

Suplente: Dr. Vicente Madrid Marina

A quienes agradezco todos sus comentarios y sugerencias para el mejoramiento de este trabajo de tesis.

**La realización de este trabajo fue posible gracias al apoyo recibido por:**

**El Instituto Nacional de Cancerología, México, D.F**

**Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Proyecto 28673M**

**CON TODO MI AMOR**

**A MIS DOS ALBERTOS**  
*Porque son toda mi vida*

**CON AGRADECIMIENTO Y AMOR A MIS PADRES:**

**ENRIQUE CARRILLO VARGAS**  
**ALEJANDRA GARCIA GALLARDO**

**Y A MIS HERMANOS**

*Que de alguna manera, todos tratamos de salir victoriosos en esta vida*

## **Agradecimientos:**

Estoy particularmente muy agradecida con la Dra. Marcela Lizano Soberón, mi directora de tesis, por todo lo que pude aprender de ella, que es de un valor incalculable. Por mi formación académica, por las palabras de aliento en aquellos momentos de desesperación, porque siempre me impulsó a seguir adelante, por su gran amistad. Por todo esto y mucho más ¡Gracias!

Agradezco también, a la Dra. Martha Torroella K. (donde quiera que se encuentre), porque fue la que me alentó en primera instancia a iniciar este trabajo.

Agradezco el apoyo brindado por el Instituto Nacional de Cancerología para poder realizar la maestría, contando con los recursos físicos y humanos del Instituto. En especial al Dr. Alejandro Mohar Betancourt, por las evaluaciones hechas al trabajo; al Dr. Gilberto Solorza L. por las facilidades proporcionadas en la recolección de las muestras; al Dr. Abelardo Meneses G. y la Dra. Margarita Ibarra por su ayuda en el diagnóstico histológico y citológico.

Y particularmente, agradezco al M. en C. Mauricio Frías Mendivil por todo su apoyo y paciencia durante el análisis estadístico de los datos.

También quiero agradecer al M. en C. Alberto Rojas Ochoa, por su valiosa ayuda en las cuestiones técnicas de la metodología, sus consejos y sugerencias para mejorar algunos procedimientos de detección.

Agradezco al Químico Clínico Erick N. De la Cruz Hdz. por las sugerencias y gran ayuda en cuestiones de informática, por su amistad y apoyo incondicional.

Finalmente, necesito agradecerle a mi hijo Alberto, el que me haya permitido terminar este trabajo, al robarle bastante de su tiempo y soportar algunos momentos de desesperación.

# INDICE

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ANTECEDENTES</b>	2
<b>INTRODUCCION</b> <b>QUE ES EL CANCER</b>	6
<b>FACTORES QUE LO ORIGINAN</b>	7
<b>COMO SE GENERA UN CANCER</b>	12
<b>CANCER CERVICOUTERINO</b> <b>EL CUELLO UTERINO SANO</b>	15
<b>NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL</b>	17
<b>CANCER INVASOR</b>	19
<b>FACTORES DE RIESGO PARA CANCER CERVICAL</b>	23
<b>VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO</b>	25
<b>CICLO VITAL</b>	30
<b>VPH Y CANCER: HISTORIA NATURAL DE LA INFECCION</b>	33
<b>OBJETIVOS</b>	37
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	38
<b>RESULTADOS</b>	46
<b>DETECCION Y TIPIFICACION VPH</b>	47
<b>ANALISIS DE DATOS HISTORIA CLINICA</b>	58
<b>ANALISIS DE DATOS HISTORIA REPRODUCTIVA</b>	63
<b>DISCUSION</b>	71
<b>CONCLUSIONES</b>	84
<b>REFERENCIAS</b>	87
<b>APENDICE</b>	98

## RESUMEN

El cáncer del cuello del útero (CaCu) es un gran problema de salud en los países subdesarrollados. Dentro de estos, México tiene una alta tasa de mortalidad por esta enfermedad. En la actualidad se acepta que ciertos tipos de virus del papiloma humano (VPH) están involucrados en su etiología. A nivel mundial, se estima que alrededor del 99.7% del cáncer cervical está asociado con la infección por VPH. Sin embargo, existe poca información en los registros de prevalencia y distribución de los tipos de Papilomavirus humano en cáncer cervical y cérvix normal en la población mexicana.

El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia y distribución de VPH en los diferentes estadios que conforman la historia natural de las neoplasias del cérvix, así como su asociación con la historia reproductiva de cada paciente, además de comparar la detección de VPH por el tipo de muestra analizada (biopsia y raspado cervical). Se analizaron un total de 154 muestras: 65 sanas, 24 lesiones de alto grado (NIC II-III), 21 lesiones de bajo grado (NIC I) y 44 casos de cáncer invasor. La detección de VPH se realizó con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con tres diferentes juegos de oligonucleótidos universales para la región L1 de VPH. La tipificación de las muestras positivas fue hecha con oligonucleótidos específicos para la región E6/E7 de VPH16, y la región LCR de VPH18, además de secuenciación directa de algunos productos de PCR.

El VPH fue detectado en el 95.5% de los casos de cáncer invasor, 91.6% de lesiones de alto grado (NIC II-III), 66.7% de lesiones de bajo grado (NIC I) y 23.1% del grupo de mujeres sanas. En los cuatro grupos estudiados el VPH 16 fue el más frecuente, seguido de VPH 18. El VPH se detectó con mayor eficiencia en las muestras obtenidas por biopsia (75%), que en aquellas obtenidas por raspado cervical.

El análisis de los datos de la historia reproductiva mostró que hay correlación con el número de parejas sexuales, la edad de inicio de vida sexual activa, el número de partos y embarazos. Además de que no se encontró asociación con tabaquismo y uso de anticonceptivos orales.

Por lo anterior, una vez más se comprueba la estrecha relación que mantiene el virus del papiloma humano en la génesis del cáncer cervicouterino. A su vez existen también una serie de factores externos e internos que actuando en conjunto pueden llevar a una lesión de bajo grado a progresar en forma más rápida hacia un cáncer invasor.

## ANTECEDENTES

El cáncer del cuello del útero (CaCu) es un problema de salud importante en países subdesarrollados. Se estima que cada año se diagnostican 500 000 casos nuevos en el mundo. Durante los últimos 35 años, la incidencia y mortalidad por cáncer de cérvix en los Estados Unidos de Norteamérica y otros países desarrollados han disminuido notablemente (Parkin *et al.* 1988; Brinton *et al.* 1992). Sin embargo en los países en vías de desarrollo la incidencia de esta patología ha presentado una tendencia a incrementarse, siendo los países latinoamericanos los que reportan las tasas de incidencia más altas (Parkin *et al.* 1988). Dentro de estos, el CaCu en México ocupa el primer lugar de causa de muerte en la población femenina en particular (RHNM, 1997; Mohar *et al.* 1998; Mohar *et al.* 2000).

Los estudios sobre la epidemiología del CaCu han demostrado que esta entidad se comporta como una enfermedad de transmisión sexual y diversos factores de riesgo parecen estar involucrados en su desarrollo, entre estos se encuentran: Inicio temprano de las relaciones sexuales y número de parejas sexuales, infecciones virales y bacterianas, hábitos reproductivos, uso de anticonceptivos orales, hábitos dietéticos y tabaquismo entre otros (Reeves *et al.* 1989). Sin embargo en estudios epidemiológicos publicados en años recientes, se concluye que hay un factor adicional que parece estar jugando un papel importante en la etiología del CaCu, esto es la infección del cérvix por un virus conocido con el nombre de Virus del Papiloma Humano (VPH) (Muñoz *et al.* 1992; Muñoz *et al.* 1993a).

Existen evidencias tanto experimentales como epidemiológicas que apoyan la hipótesis de que el Virus del Papiloma Humano puede ser considerado como el principal agente etiológico de neoplasia cervical. Por ejemplo: algunas líneas celulares que se han derivado de pacientes con CaCu tienen ADN viral integrado y las secuencias insertadas se conservan (HeLa, SiHa, CaSki); un alto porcentaje de casos de CaCu y lesiones preinvasoras presentan ADN viral al ser analizadas; las proteínas tempranas E6 y E7 de VPH inducen transformación de cultivos celulares (Boshart *et al.* 1984; Reeves *et al.*

1989). Sin embargo la versión más contundente del papel que puede estar jugando el VPH en las neoplasias del cérvix como agente causal y primer agente necesario, nos la da un estudio internacional llevado a cabo en 22 países del mundo donde el porcentaje de VPH encontrado en cáncer fue del 99.7%; en este estudio se observa que independientemente de otros factores de riesgo asociados al CaCu, la asociación que tiene el VPH con esta neoplasia cervical es consistente en diferentes países del mundo (Bosch *et al.* 1995; Walboomers *et al.* 1999).

El Virus del Papiloma Humano, es un virus que infecta epitelios y mucosas del ser humano, y se subdivide en tipos de acuerdo a homologías en su material genético, reconociéndose en la actualidad más de 90 tipos diferentes. Una de las características del VPH, es que para replicarse requiere de células que estén en proceso de diferenciación, por lo que su cultivo hasta el momento es limitado. Por lo tanto, su diagnóstico y tipificación se basa en el estudio colposcópico (lesiones acetoblanco del epitelio), cambios citológicos vistos en la prueba de Papanicolaou (células coilocíticas), estudio histológico (presencia de condiloma), por análisis inmunológico detectando anticuerpos contra proteínas del virus y finalmente por identificación de la secuencia del ADN viral utilizando diversas técnicas de biología molecular (Dot-Blot, Southern-Blot, Hibridación *in situ*, Reacción en Cadena de la Polimerasa, Captura Híbrida) (Schiffman *et al.* 1992; Campion *et al.* 1995; Clavel, 1998).

Utilizando algunos de estos métodos en muchos trabajos se ha detectado la presencia de material genético (ADN) de este virus en un gran porcentaje de casos de CaCu. En el estudio con mayor número de casos que se ha realizado, se encontró la presencia de VPH en el 99.7% de los tumores invasores del cérvix analizados. Los tipos virales que se encontraron con mayor frecuencia fueron el VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33 y 35. De estos los más asociados a neoplasia maligna son el VPH 16 y VPH 18. El tipo 16 es el responsable de aproximadamente un 50% de las infecciones en CaCu, mientras que el VPH 18 alcanza un 18-20% (Bosch *et al.* 1995; Walboomers *et al.* 1999).

En el Instituto Nacional de Cancerología se han realizado trabajos previos con las técnicas de Dot y Southern Blot, en los cuales se encontró una prevalencia de VPH en general de 39% y 34.3% respectivamente en muestras de CaCu (Ordóñez *et al.* 1993; Mendoza *et al.* 1994). Sin embargo, debido a la poca sensibilidad de las técnicas utilizadas en estos trabajos, es claro que la prevalencia de infección por VPH en la población estudiada se encuentra subestimada. De ahí surge la inquietud de estimar la prevalencia de esta infección en mujeres mexicanas, por medio de una técnica más sensible como es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), la cual es reconocida por diferentes autores como la de mayor sensibilidad en la detección de secuencias de ADN virales y celulares (Bauer *et al.* 1991; Schiffman *et al.* 1992; Guerrero *et al.* 1992).

En otro estudio más reciente (Torroella *et al.* 1998b) se utilizó la técnica de PCR e hibridación con Dot Blot para analizar una población del mismo instituto. En este trabajo se reportan prevalencias para VPH de 87% para CaCu, 83.3% para lesión de alto grado, 33.3% para lesión de bajo grado y 17% en mujeres sanas.

Por otro lado, los estudios de prevalencia de VPH en cérvix, publicados recientemente, han demostrado que ésta depende no sólo del tipo de población estudiada y de la técnica de diagnóstico utilizada en su detección, sino que también el tipo de muestreo de la lesión cervical parece influir. Por ejemplo, en muestras de biopsia o raspado cervical, las prevalencias difieren en un 50 % a favor de las biopsias (Muñoz *et al.* 1992). En este contexto uno de los objetivos de este trabajo es analizar tanto muestras obtenidas de biopsia, como de raspado cervical de mujeres con CaCu, lesiones premalignas y lesiones benignas del cérvix.

Por lo anteriormente mencionado y considerando que la infección por el Virus del Papiloma Humano ha alcanzado proporciones epidémicas en algunos países subdesarrollados (Tamayo *et al.* 1993), creemos que en México, es necesario realizar estudios con técnicas más sensibles que proporcionen resultados más certeros para determinar la prevalencia de infección por VPH, los tipos y subtipos más frecuentes, así como cuantificar los principales factores de riesgo asociados a la infección por VPH.

A pesar de que algunos grupos de investigadores han realizado estudios que abordan este problema en nuestro país, se ha publicado muy poco sobre la prevalencia de los diferentes tipos de VPH asociados a cáncer de cérvix en México, y mucho menos en los diferentes niveles de neoplasia intraepitelial cervical (lesión de bajo grado y lesión de alto grado), que conforman la secuencia de la historia natural de esta patología, y en mujeres con citologías normales, que es el inicio de esta historia natural. De hecho el trabajo previo de la Dra. Torroella constituye un buen punto de partida para seguir indagando sobre la distribución de papilomavirus en mujeres mexicanas.

En este estudio se propone determinar la frecuencia y distribución de infección por VPH en las diferentes etapas que conforman la historia natural del cáncer cervicouterino en una población de mujeres mexicanas, tanto en biopsia como en raspado cervical, así como identificar que tipos de VPH están presentes en la población, y al mismo tiempo conocer los antecedentes gineco-obstétricos y la conducta sexual de las mujeres en estudio, sobre la base de su posible relación con la presencia de infección por papilomavirus.

# INTRODUCCION

## QUE ES EL CANCER

El cáncer es un trastorno en los mecanismos que controlan la proliferación y la diferenciación de las células de organismos superiores (la célula eucariota). Esto quiere decir, que en los tumores existe una deficiencia del proceso de diferenciación y muerte celular, además de una estimulación del proceso de proliferación celular.

### Célula normal y célula maligna

En un organismo pluricelular existe un respeto a mantener una estructura jerárquica, así las células que integran un tejido normal se caracterizan por tener rasgos como los siguientes:

- respetan una división de funciones dentro del tejido
- tienen un tiempo de vida limitado
- presentan inhibición al contacto
- su proliferación es controlada
- presentan dependencia de anclaje
- tienen un citoesqueleto con una organización bien determinada

En contraste con las células normales, las células malignas han perdido estas características, pero han adquirido otras, como:

- son inmortales
- la proliferación es descontrolada
- son independientes de anclaje
- hay pérdida de la inhibición al contacto
- existe una diferenciación errónea de las células
- la bioquímica propia de la célula maligna es diferente a la utilizada en la célula normal.

## FACTORES QUE ORIGINAN EL CANCER

El proceso por el cual se origina un tumor maligno a partir de una célula que alteró sus controles de proliferación, diferenciación, o ambos, es un proceso complejo que transcurre a lo largo del tiempo y a través de diferentes etapas.

Primero es necesario que una célula se haga *inmortal*, después se *transforme* para que finalmente pueda ser *tumorigénica* en un animal. Son tres estadios diferentes y progresivos que deben ir acumulándose para después dar lugar a un clon tumoral. Sin embargo, hay indicios epidemiológicos de que la malignización es un proceso largo y complejo que transcurre a través de varios años. Se ha observado en enfermos de cáncer que hay un periodo de latencia de varias decenas de años entre la exposición al agente cancerígeno y las primeras lesiones premalignas y, finalmente, la transformación de algunas de éstas alteraciones en cáncer. Estos estudios permitieron establecer los ya clásicos términos de *iniciación*, *promoción* y *progresión*, como las etapas propias de la historia natural de las neoplasias malignas (Van Nagell, 1993; Yuspa, 1997).

Se habla de *iniciación* como un daño permanente y transmisible en el ADN de una célula que, si no se repara, se fija como mutación, quedando la célula iniciada, sin que por ello se vea conducida a una transformación maligna.

La *promoción* es un proceso donde ocurre una expansión clonal, que puede ser reversible, a partir de la célula que se inició. En esta etapa se requiere de una estimulación continua del cancerígeno, aquí se forma propiamente el tumor o neoplasia, el cual esta compuesto de células benignas. Cuando se trata de una neoplasia que se ha malignizado, entonces se habla de un cáncer. El estadio neoplásico comprende diversas etapas: puede presentarse la *neoplasia benigna*, en la que existe una clara delimitación del clon neoplásico que se mantiene dentro de una cápsula que lo circunda. La *neoplasia premaligna*, llamada también intraepitelial cuando se presenta en epitelios (displasias), caracterizada por una serie de cambios morfológicos nucleares. La displasia puede transformarse en carcinoma *in situ* en el 80% de los casos en diez años, y éste puede evolucionar a cáncer invasor en un 20% de los casos en cinco años, por lo tanto la

progresión tumoral se entiende actualmente como un fenómeno que puede o no ocurrir en una neoplasia benigna dependiendo del estímulo al que este expuesto (Campion, 1995; Trichopoulos, 1997).

La *progresión* tumoral es, finalmente, la adquisición por la neoplasia del carácter maligno, se observa la aparición secuencial de poblaciones celulares cada vez más aberrantes genéticamente. El rasgo distintivo de esta etapa final es la capacidad de escapar a la respuesta inmune del huésped, invadir y colonizar o metastatizar órganos distantes, originando nuevas formaciones tumorales, con células cada vez más autónomas y agresivas. Toda esta secuencia de eventos se conoce como la cascada metastásica, que es la que realmente ocasiona la muerte del paciente con cáncer.

En el ser humano, las observaciones epidemiológicas han permitido estimar en aproximadamente 10-20 años la duración del proceso de carcinogénesis, desde la primera exposición al agente iniciador hasta la aparición del cáncer. Por lo tanto la historia natural de un cáncer es en realidad más compleja de lo que predice el modelo experimental de tres etapas (iniciación, promoción y progresión), ya que existen estadios intermedios, y se considera un proceso biológico continuo (Van Nagell, 1993; Trichopoulos, 1997; Torroella, 1998a).

## **FACTORES EXOGENOS Y CANCER**

En cuanto a las causas que pueden estar originando un cáncer, hoy en día se acepta que éstas se dividen en dos grandes grupos: las exógenas o ambientales, asociadas al 80-90% de todos los cánceres padecidos por el ser humano, y las endógenas, a las que se les debe el 10-20% restante.

De alguna manera, en mayor o menor medida, todos vivimos sumergidos en un mundo de compuestos químicos. El uso continuo de medicamentos variados, aditivos alimenticios, cosméticos, pesticidas, productos industriales y del hogar, el tabaquismo activo o pasivo, la variada exposición ocupacional y el tipo de alimento que ingerimos o se deja de ingerir en la dieta, etc., son algunos de los factores a que voluntaria o involuntariamente nos vemos a diario expuestos.

### **Compuestos Químicos y Cáncer**

Muchos de estos compuestos pueden inducir mutaciones en el ADN (mutágenos), otros son capaces de inducir cáncer (carcinógenos), y otros pueden causar malformaciones congénitas (teratógenos). Todos estos compuestos se engloban bajo el término genérico de *agentes genotóxicos*. Con base en el hecho de que el ambiente provoca la gran mayoría de los tumores malignos, estos podrían prevenirse en tanto seamos capaces de conocer y controlar la exposición de los seres humanos a su ambiente.

Por otro lado, la investigación más actual en carcinogénesis química se esta centrando en el estudio de *compuestos no genotóxicos*, que a dosis elevadas pueden inducir cáncer, al parecer estimulando la proliferación celular, ejemplos de estos compuestos son todos los procesos de inflamaciones, heridas, erosiones, infecciones, irritaciones, cicatrizaciones, daño oxidativo, algunas hormonas, etc. Es así como se explica que una infección o inflamación crónica en un tejido (bronquitis, cervicitis), sea por sí misma un paso previo condicionante de la posible malignización del mismo, independientemente de la acción adicional de otros factores etiológicos (Yuspa, 1997).

### **Agentes Físicos y Cáncer**

El cáncer también puede ser la consecuencia de la acción de agentes físicos, como son, las radiaciones, las cuales pueden ser *genotóxicas* y *no genotóxicas*. Es conocido que las radiaciones *genotóxicas* pueden ser *ionizantes* y *no ionizantes*. Las *ionizantes* (rayos gamma, rayos X, los neutrones o partículas cargadas) son las de mayor contenido energético y atraviesan la materia viviente ionizando a su paso átomos y generando los

llamados radicales libres, que son grupos químicos muy activos y nocivos, causantes del daño a nivel de macromoléculas como ADN y proteínas. Las radiaciones genotóxicas *no ionizantes* están representadas por la radiación ultravioleta, la cual interactúa con el ADN induciendo la formación de dímeros entre dos bases de timina vecinas, interfiriendo así con el proceso normal de replicación del ADN. Las radiaciones genotóxicas ionizantes son las más dañinas de todas ya que son portadoras de una gran energía de muy alta penetración con capacidad destructiva en la materia viva. Este tipo de radiación causa rompimientos cromosómicos en las cadenas de la molécula de ADN, y se ha encontrado asociada con la inducción de neoplasia maligna hematopoyética (leucemias y linfomas) en algunos individuos expuestos (Hall, 1997).

La radiación *no genotóxica* que, según investigaciones recientes, pueden tener también potencial cancerígeno, ya sea de manera independiente o en sinergismo con compuestos químicos, parece estar representada por la zona del espectro electromagnético con longitudes de onda mayores que la del infrarrojo, o sea, las microondas, las ondas de radio, y toda la radiación conocida como de baja frecuencia, que es la radiación emitida por los equipos electrónicos de uso cotidiano.

### **Agentes Biológicos y Cáncer**

En el terreno de los factores biológicos destacan principalmente algunos virus que, después de muchos años de controversia sobre su participación en la génesis del cáncer, recientemente se acepta como la causa de ciertos tipos de neoplasia maligna, por el daño que inducen en el ADN de las células infectadas.

Desde hace muchos años se conoce que los virus de origen ADN o ARN son la causa de la mayor parte de los tumores en animales como aves, roedores, gatos, y monos que padecen principalmente sarcomas y leucemias de las cuales se ha comprobado su naturaleza viral. En cuanto a la participación de los virus en las neoplasias humanas, en la actualidad se acepta que ciertas neoplasias pudieran tener un origen viral (Cramer, 1993; Murnane, 1997).

### *Virus ADN Tumorales:*

1. *Herpes* tipo alfa: *Herpes simplex* tipo 1 y 2  
Tipo beta: *Herpes simplex* tipo 8, identificado en algunos sarcomas de Kaposi.  
Tipo gamma: Epstein-Barr, parece ser la causa de Linfoma de Burkitt.
2. *Hepatitis B*: humano y otros no humanos, parece relacionarse con cáncer hepático
3. *Papilomavirus*: humanos y de otras muchas especies, relacionado con cáncer anogenital.
4. *Polyoma*: polyoma (murino), SV40 (monos) en mesoteliomas, BK y JC (humanos) en tumores neurales.

### *Virus ARN Tumorales:*

Estos virus causan los frecuentes tumores que aparecen en muchos animales (leucemias, linfomas, sarcomas y tumores mamarios en aves, roedores, gatos y monos). Los primeros retrovirus humanos se identificaron en dos pacientes que padecían linfoma de células T. Hoy en día se conocen como los virus de la familia HLTV (Human Lymphotropic-Leukemia T cell Viruses). Estos son: HTLV I, HTLV II y HTLV III.

### **Estrés y Cáncer**

Otra causa que se relaciona con el aspecto ambiental, pero sobre todo con la forma y modo de vida del hombre en nuestros días es el estrés. El ser humano de la época actual vive una vida cargada de estrés, de tensión nerviosa, de ansiedad, de depresión, con temores, angustias y preocupaciones constantes.

Con respecto a esto, hay claros indicios de que todas estas cargas emocionales negativas pueden contribuir a la aparición de un cáncer, pero se desconocen los verdaderos mecanismos que podrían existir detrás de este fenómeno, aunque se sospecha del papel que pueda estar jugando la inmunodepresión característica de las fases depresivas, en la disminución de la vigilancia inmunológica (Schlesinger, 1993).

## FACTORES ENDOGENOS Y CANCER

Estos factores pueden ser de naturaleza espontánea o causados por la herencia. Algunos ejemplos de esto son las mutaciones espontáneas, proceso perfectamente natural y común que ocurre en las células, como la *infidelidad de la ADN Polimerasa* que puede cometer errores durante la replicación del ADN causante de mutaciones; la *depuración espontánea* (pérdida de bases púricas), también causa de mutaciones puntuales; el *daño oxidativo* causado por radicales libres; los *elementos móviles* (retrovirus endógenos y retrotransposones) que son fuente importante de mutagénesis endógena, y por último la *deaminación espontánea de la 5-metil citocina* a timina, que permanece como mutación por no ser reparable eficientemente. Si la replicación del ADN ocurre con fallas y no son reparadas, cualquiera de estos daños mencionados quedan fijados como mutación espontánea, dando pauta al inicio de alguna transformación maligna en la célula (Kastan, 1997).

En cuanto a los factores atribuibles a la herencia sólo explican la aparición de 1-5% de los cánceres, y estos se deben a la transmisión de mutaciones en genes recesivos llamados supresores que se transmiten de generación en generación en las llamadas familias con síndromes de cáncer, como ejemplo tenemos el retinoblastoma y cáncer de mama.

## COMO SE GENERA EL CANCER

Ya sea que se trate de compuestos químicos, de radiaciones, de virus, o de elementos endógenos, se ha propuesto que el blanco directo o indirecto de todos estos factores cancerígenos es el material genético (ADN). Hoy en día se sabe que el daño ocurre específicamente sobre genes determinados y que todos estos genes comparten algo en común, es decir, los llamados *genes del cáncer* que se conocen hasta el momento codifican para proteínas, que de una u otra manera, controlan las funciones de proliferación y diferenciación en la célula eucariótica. Por lo tanto, una mutación en uno de estos genes, si no se repara y queda fijada, se convertirá en una mutación iniciadora y esta célula alterada será la célula madre del clon que dará lugar a la neoplasia (Fidler, 1997; Lewin, 1998).

Dos eventos importantes en la investigación científica, *el descubrimiento de los retrovirus* en animales, por un lado, y los estudios relacionados con el cáncer hereditario infantil llamado *retinoblastoma*, por el otro, condujeron al descubrimiento de las dos grandes categorías de genes relacionados con el proceso maligno: los *oncogenes* y los *genes supresores o antioncogenes*.

### **Oncogenes**

Fueron inicialmente identificados como genes portados por virus que causan transformación en la célula huésped, al frustrar o modificar las vías normales de control de la proliferación celular, independizándolas de sus elementos de control. Es decir, actúan como reguladores positivos de la proliferación celular. Una gran mayoría de oncogenes tienen su contraparte celular que está involucrada en funciones normales de la propia célula. Estos genes celulares son llamados *proto-oncogenes* y en ciertos casos al presentarse alguna mutación o activación aberrante en la célula se asocian con formación de tumores (Bishop, 1983; Perkins, 1997; Lewin, 1998).

Se han identificado cerca de 100 oncogenes, estos quedan comprendidos dentro de varios grupos con una amplia gama de funciones que pueden ser desde proteínas de membrana hasta factores de transcripción, lo que nos permite comprender todos los posibles cambios que pueden estar involucrados en la formación tumoral (Varmus, 1984). Algunos autores los han clasificado de acuerdo a su sitio de acción en: *Oncogenes nucleares* (aquellos cuyos productos actúan en el núcleo), entre los que se encuentran: myc, N-myc, L-myc, fos, jun, el antígeno E1A de Adenovirus, el antígeno T de SV40, el antígeno T de Polyoma, y la proteína E7 del virus del papiloma humano, entre otros. A todos estos oncogenes se les atribuye la función de immortalización de las células primarias en el proceso de malignización (Varmus, 1984; Bishop, 1985; Lewin, 1998).

*Oncogenes citoplásmicos* (aquellos cuyos productos actúan en el citoplasma), entre estos figuran: H-ras, N-ras, K-ras, src, erbB, fps, entre otros. A ellos se les atribuye la función de transformación de las células ya immortalizadas por los oncogenes nucleares.

## Genes Supresores

La existencia de estos genes supresores del cáncer se registró por primera vez a partir de los resultados obtenidos con experimentos de hibridación de células somáticas: la fusión de células normales con células malignas resulta en una progenie híbrida de células normales, demostrando con esto que la malignidad se comporta como un rasgo recesivo. Sin embargo si estos híbridos se dejaban crecer, después de varios pases se observó que espontáneamente comenzaban a perder sus cromosomas y las células se volvían malignas; finalmente, la malignidad se lograba revertir si a la célula maligna se le incluían algunos cromosomas normales (Lasko, 1991; Weinberg, 1991).

La evidencia más completa de su naturaleza es proporcionada por ciertos cánceres hereditarios, en el cual el paciente con la enfermedad desarrolla tumores que tienen pérdida de ambos alelos y por lo tanto carecen de un gen activo. Hasta la fecha se conocen cerca de 10 genes supresores de tumores, pero sólo hay dos bien caracterizados. Uno de ellos codifica, para la proteína Rb, involucrado en Retinoblastoma infantil y el otro, para la proteína P53 considerado como el guardián del genoma celular. De una u otra manera estos genes supresores representan pérdida de funciones en aquellos genes que usualmente imponen alguna señal de paro en el ciclo celular o crecimiento celular y por lo tanto la pérdida de estas señales se traduce en una tumorigénesis (Varmus, 1984; Perkins, 1997; Lewin, 1998).

En resumen, el cáncer es una enfermedad crónico-degenerativa, su desarrollo es generalmente lento y se lleva a cabo a través de cambios biológicos en secuencias de eventos variados, lo que condiciona alteraciones genéticas múltiples que pueden involucrar la activación de oncogenes y la pérdida de genes supresores del crecimiento.

## CANCER CERVICOUTERINO

### DESCRIPCION MORFOLOGICA

El cáncer del cuello uterino (CaCu) es el segundo cáncer más frecuente entre las mujeres en el mundo entero. Se estima que el número de nuevos casos diagnosticados por año a nivel mundial es de alrededor de 500,000 casos. Esto representa el 12% de todos los cánceres diagnosticados en mujeres y casi la mitad muere por esta causa (Parkin, 1988; DiSaia, 1997).

Epidemiológicamente el cáncer cervical se comporta como una enfermedad de transmisión sexual. Siendo más común en mujeres que han tenido varias parejas sexuales y en mujeres cuyas parejas sexuales son promiscuas.

Se considera que la lesión precursora del CaCu es la Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC). Estas generalmente empiezan con una lesión bien diferenciada (NIC I o displasia leve), pasan por una fase menos diferenciada (NIC II o displasia moderada), luego una lesión intraepitelial indiferenciada (NIC III o displasia severa) y finalmente terminan en cáncer invasor (en diferentes estadios) cuando las células neoplásicas han atravesado la membrana basal e invadido el tejido subyacente. El tiempo de evolución de las lesiones que progresan de NIC I a NIC III, y de este a CaCu invasor es muy variable, puede ser generalmente de 10 a 20 años (Kiviat, 1993; Crum, 1993; Torroella, 1998a).

### EL CUELLO UTERINO SANO

Durante los últimos 50 años, se ha estudiado exhaustivamente el cuello uterino, tanto sano como enfermo, con lo que se ha obtenido más conocimiento e información de la historia natural de la neoplasia cervical.

Históricamente el cuello uterino normal se ha descrito en la literatura ginecológica como cubierto por dos epitelios: a) **El Epitelio Escamoso Original** (cubre la vagina y el

ectocérvix), desde un punto de vista puramente colposcópico, este epitelio es el menos importante y variable del cuello, y la transformación neoplásica es muy rara, predominando las alteraciones por patógenos vaginales y variaciones hormonales (Campion, 1995).

**b) El Epitelio Columnar** (cubre el canal endocervical). Cuando el epitelio columnar se evierte al ectocérvix se provee de las bases para la transformación metaplásica. El epitelio columnar se extiende hacia el exocérvix en la mayoría de las mujeres como una variante de lo normal (metaplasia escamosa) que raramente requiere tratamiento a menos que se desvíe hacia la transformación neoplásica (Campion, 1995).

Originalmente, el epitelio escamoso se une con el epitelio columnar en la región del orificio externo formando lo que se conoce con el nombre de unión escamocolumnar. La posición anatómica de esta región varía entre diferentes mujeres, así como en las diferentes fases de la vida de una misma mujer (Cramer, 1993; DiSaia, 1997). Durante los años reproductivos, el epitelio columnar endocervical se "transforma" y es reemplazado por epitelio escamoso. Este proceso ocurre en la región de la unión escamocolumnar original, delineando una zona circular un poco irregular alrededor de la abertura externa, que varía en su ancho y se le conoce como *zona de transformación* o zona T.

La zona de transformación del cuello es un área donde se encuentran metaplasia escamosa inmadura y madura, fisiológica y anormal. Es en esta zona de transformación donde casi siempre se origina la neoplasia. El entender el proceso de la metaplasia escamosa es la clave para el estudio de la carcinogénesis cervical. La metaplasia escamosa inicial es el evento crítico en el futuro desarrollo neoplásico y en el desarrollo de los precursores del cáncer cervical (Cramer, 1993; Campion, 1995; DiSaia, 1997).

## NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL

Las neoplasias intraepiteliales del cérvix (NIC) se definen como lesiones escamosas intraepiteliales en proliferación, que presentan maduración anormal, alargamiento nuclear y atipia (aglutinación gruesa de la cromatina y contornos nucleares irregulares) (Cannistra, 1996; Stern, 1996). De acuerdo a Barrón y Richart (1968), estas lesiones se clasifican en tres grupos dependiendo de la extensión y distribución de las células malignas en el epitelio, Neoplasia intraepitelial grado I (displasia leve), Neoplasia intraepitelial grado II (displasia moderada) y Neoplasia intraepitelial grado III (displasia severa o carcinoma *in situ*) **Figura 1**.

Tradicionalmente, estas diferentes lesiones se han considerado como una serie de cambios moleculares que se acumulan y que con el paso del tiempo pueden ir generando mutaciones no reparadas y por ende una progresión a la malignidad, la cual es favorecida de la misma manera por la presencia de Virus del Papiloma Humano, en particular por los tipos de alto riesgo (Richart, 1968; Schiffman, 1993).

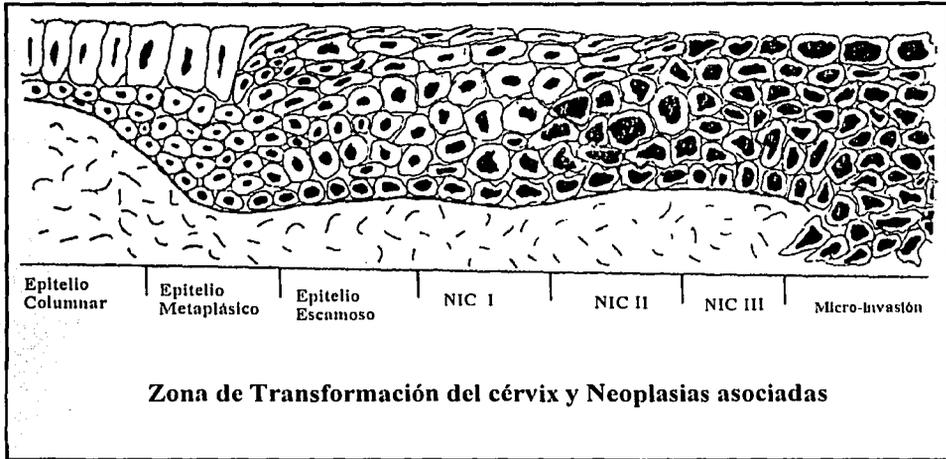
La caracterización de cada una de estas lesiones esta basada en la distribución de células indiferenciadas en el epitelio cervical (Richart, 1968; Richart and Wright, 1993; Crum, 1993; Di Saia, 1997), de la siguiente manera:

**NIC I** Se reconoce cuando las células del tercio inferior carecen de diferenciación citoplásmica o maduración normal (pérdida de polaridad). Las figuras mitóticas son pocas y las otras dos terceras partes del epitelio no muestran ninguna anormalidad nuclear.

**NIC II** Los cambios anormales que ocurren en la NIC I se observan en este caso en los dos tercios inferiores del epitelio.

**NIC III (Carcinoma *in situ*)** Se presentan estratos celulares indiferenciados en todo el epitelio, es común el pleomorfismo celular y nuclear, y las figuras mitóticas son anormales.

**Figura 1:** La historia natural de la neoplasia cervical en la zona de transformación del epitelio cervical (Tomado de Stern P., 1996)



Actualmente, no se conoce el tiempo que se requiere para que una lesión evolucione desde displasia leve a displasia severa, o a un cáncer invasor, determinándose por medio de modelos matemáticos un tiempo aproximado de entre 10 y 20 años. Barron and Richard (1968) han calculado que el tiempo promedio que le toma a una lesión intraepitelial progresar al siguiente grado de malignidad es de aproximadamente 5 años.

El proceso de diagnóstico de estas lesiones precursoras inicia con el análisis de un frotis cervical (Papanicolaou), esta prueba ha sido y seguirá siendo la herramienta básica de detección temprana, el resultado puede ser reportado de acuerdo a una de las clasificaciones siguientes: **Tabla 1** (Koons, 1990; Crum, 1993; Richart and Wright, 1993; Cannistra, 1996; DiSaia, 1997).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 1: Comparación de la Clasificación Citológica**

hallazgo	sistema de clasificación		
	Grupo	Grado	Bethesda
Negativo	Grupo I	Negativo	Negativo
Incierto	Grupo II	Incierto	ASCUS
Anormal	Grupo III	NIC	Anormal
	IIIa	NIC I /condiloma	LEI de bajo grado
	IIIb	NIC II	LEI de
	IIIc	NIC III	alto grado
	Grupo IV	NIC III	
	Grupo V	Cáncer	Cáncer

LEI. Lesión Escamosa Intraepitelial

ASCUS. ( por sus siglas en Inglés : Atypical squamous cells of unknown significance)

NIC. Neoplasia Intraepitelial Cervical

## CANCER INVASOR DEL CÉRVIX

Se habla de un cáncer invasor cuando las células tumorales no están formando una estructura bien definida, circunscrita y local, sino que, por el contrario, pueden migrar, atravesar la membrana basal del tejido original y trasladarse a través del torrente sanguíneo o linfático a órganos distantes que pueden colonizar o invadir, para formar nuevos crecimientos tumorales.

El cáncer cervicouterino (CaCu) tiene un patrón de progresión relativamente ordenado. Se caracteriza primeramente por diseminación locoregional a los órganos pélvicos y ganglios linfáticos regionales y posteriormente a órganos a distancia.

Esta enfermedad se puede presentar en distintos tipos histológicos. La información obtenida del registro histopatológico de neoplasias malignas en México (RHNM, 1997), señala que la variante histológica más frecuente en México es el carcinoma de células escamosas (91.5%), sigue en orden de importancia el adenocarcinoma (3.7%), el carcinoma SAI (2.8%), el carcinoma adenoescamoso (1.7%) y otras variedades menos frecuentes, entre las que se encuentra el carcinoma de células pequeñas. Por otro lado, algunos estudios indican que existen diferentes factores de riesgo asociados a CaCu según el tipo histológico de que se trate, además de que esto está también afectando el grado de agresividad del tumor y por consiguiente el tiempo de sobrevida del individuo (Platz, 1995; Meneses-García, 1998).

El sistema de clasificación por etapa o estadio se basa en criterios clínicos establecidos por la Federación Internacional de Ginecología y obstetricia (FIGO), para evitar incongruencias entre las instituciones (Crum, 1993; Cannistra, 1996; DiSaia, 1997) (Figura 2).

**Estadio I:** La enfermedad esta exclusivamente limitada al cérvix

- IA: Enfermedad microinvasiva, identificada sólo microscópicamente.
- IA1: Invasión al estroma menor de 3 mm de profundidad y 7 mm horizontal.
- IA2: Invasión al estroma de 3-5 mm de profundidad y no más de 7 mm de extensión horizontal.
- IB: Carcinoma invasor confinado al cérvix, diagnóstico macroscópico.
- IB1: Lesión clínica menor de 4 cm en tamaño.
- IB2: Lesión clínica mayor de 4 cm en tamaño.

**Estadio II:** El cáncer se extiende más allá del cérvix, sin alcanzar la pared pélvica; involucra a la vagina sin comprender el tercio inferior, puede haber infiltración al parametrio, pero no a los lados laterales de la vagina.

**IIA:** Tumor que se ha extendido en los dos tercios superiores de la vagina.

**IIB:** Infiltración al parametrio lateralmente, sin alcanzar las paredes laterales de la pared pélvica.

**Estadio III:** El tumor involucra el tercio inferior de la vagina o la pared pélvica o causa hidronefrosis.

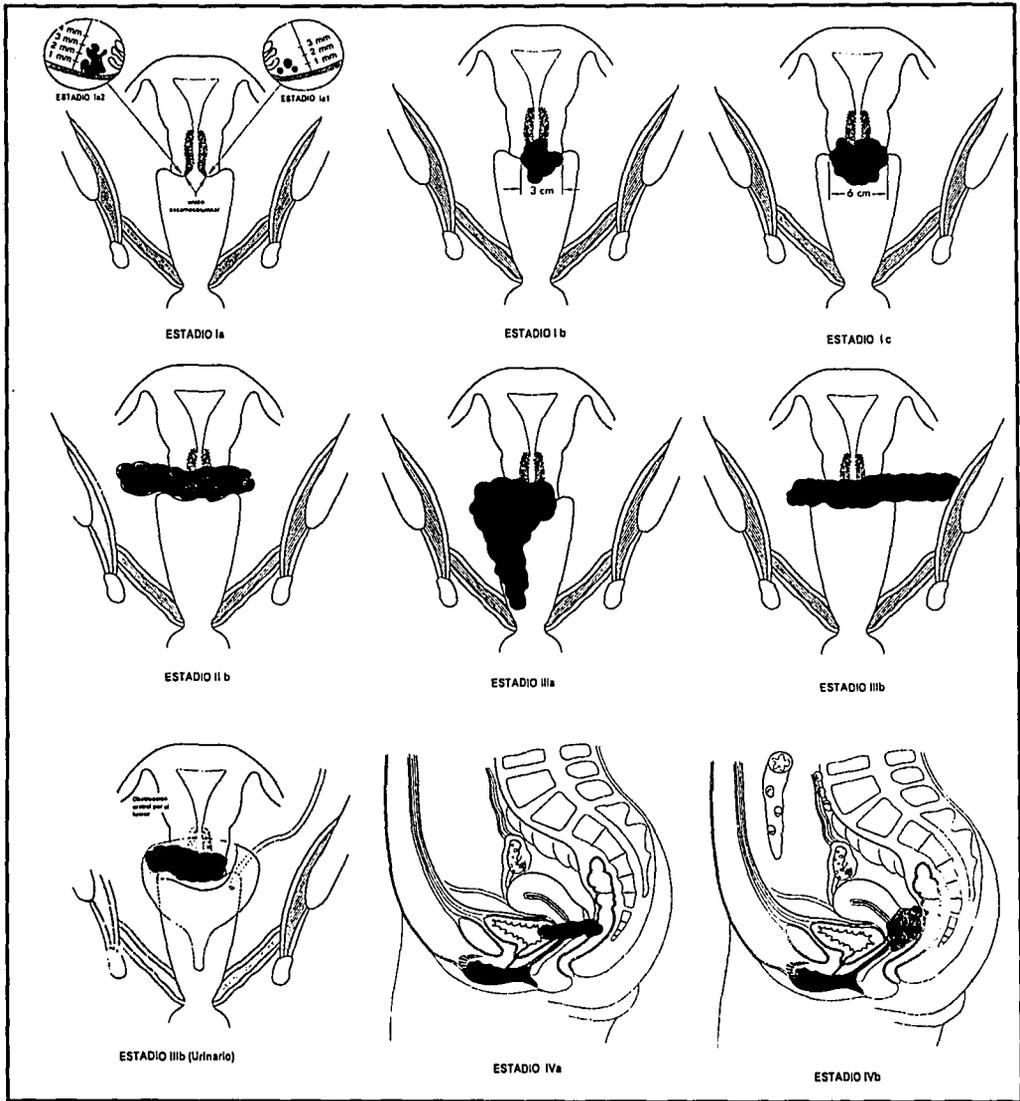
**IIIA:** El cáncer invade el tercio inferior de la vagina.

**IIIB:** Diseminación del tumor a la pared pélvica.

**Estadio IV:** El tumor afecta órganos vecinos o distantes.

**IVA:** Involucra la vejiga o mucosa rectal (órganos adyacentes).

**IVB:** Metástasis a distancia.



**Figura 2:** La clasificación por estadio de la enfermedad esta basada en diversos estudios de diagnóstico como la examinación fisica, radiografías de rutina, colposcopia, citoscopia, proctosigmoidoscopia y estudios de Bario del colón inferior y recto, entre otros (tomado de: DiSaia PJ and Creasman WT, "Clinical Gynecologic Oncology", Fifth ed., 1997, pag: 1-32).

## FACTORES DE RIESGO PARA CANCER CERVICAL

Un gran número de estudios epidemiológicos realizados por diversos investigadores han llegado a la conclusión de que el cáncer cervical se comporta como una enfermedad de transmisión sexual y que diferentes factores de riesgo parecen estar involucrados en su desarrollo. Estos estudios asocian varios indicadores de actividad sexual con el cáncer cervical como: estado civil, historia reproductiva, historia de enfermedad sexualmente transmitida, estado socioeconómico y raza, entre otras. Cabe aclarar que el estrato económico, la raza y la educación tienen solamente un papel indirecto en la epidemiología de esta enfermedad (Bosch, 1992; Schiffman, 1993; Muñoz, 1993a; Burk, 1996; Frías, 1999). La causa del cáncer cervical refleja un juego complejo entre agentes específicos transmitidos sexualmente, un epitelio metaplásico inestable de la zona de transformación cervical y cofactores que influyan en la inmunidad del epitelio cervical (Campion, 1995).

Existen dos fases importantes asociadas a la aparición del cáncer cervical. La fase más crítica es el período de la metaplasia escamosa en la pubertad y adolescencia temprana, cuando una mujer joven comienza a tener relaciones sexuales a temprana edad puede incrementar la sensibilidad a los efectos de un agente transmitido sexualmente (Reeves, 1985; Campion, 1995). La siguiente fase importante es el primer embarazo ya que el impacto hormonal del primer embarazo causa hipertrofia del cuello uterino. El epitelio columnar del endocérnix se evierte hacia el ectocérnix y queda expuesto al ambiente ácido de la vagina y comienza una metaplasia escamosa. La importancia clínica de entender la patogénesis de la neoplasia cervical radica en que una vez que la mujer ha pasado la pubertad, la adolescencia temprana y su primer embarazo sin desarrollar una lesión, entonces el riesgo de desarrollar una neoplasia escamosa en el futuro es mínima, e inversamente si una mujer desarrolla alguna lesión en estos períodos importantes de su vida reproductora temprana, tiene un alto riesgo de presentar una neoplasia significativa en el futuro (Muñoz, 1993b; Campion, 1995).

Por otro lado, también se sugiere que el número de parejas sexuales es el riesgo más importante para la enfermedad y que es independiente de la edad en que se tuvo la

primera relación sexual. De igual manera el comportamiento sexual del varón puede ser aún más importante, ya que se estaría hablando de una gran promiscuidad, en donde se tiene el riesgo de múltiples contagios de diferente índole (Reeves, 1985).

Debido a lo anterior, durante mucho tiempo se ha considerado que el cáncer cervicouterino tiene un vínculo etiológico con un agente infeccioso de transmisión sexual. Desde 1965 hasta 1984, el virus del herpes simple tipo II se consideró como posible candidato en casos de cáncer cervicouterino ya que numerosos estudios seroepidemiológicos mostraban una prevalencia de anticuerpos más alta que en los controles (Nelson, 1984; Muñoz, 1993b). Sin embargo el significado de estas asociaciones no quedó del todo bien establecido. El surgimiento posterior de las técnicas de hibridación permitieron la identificación de otro tipo de virus conocido actualmente con el nombre de Virus del Papiloma Humano (VPH).

La evidencia epidemiológica de una asociación del VPH con el cáncer cervical, tardo un poco más en establecerse, porque inicialmente en estudios de casos y controles bien diseñados se utilizaron métodos poco precisos para la detección de ADN del VPH. A partir de 1985, el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer en Lyon, Francia inició un programa de investigación sobre la etiología del cáncer cervicouterino en diferentes países del mundo. Hasta la fecha los resultados de esos proyectos han contribuido notablemente a esclarecer la naturaleza y la fuerza de la asociación entre el cáncer cervical y el virus del papiloma humano (Muñoz, 1993a; Muñoz *et al.* 1994; Bosch, 1995).

Por otra parte, estudios epidemiológicos han asociado otros factores etiológicos con la génesis del CaCu como son el tabaquismo, las hormonas sexuales, la dieta, las infecciones crónicas del cérvix, el virus del herpes y el estado del sistema inmunológico, los cuales pudieran participar en alguna etapa del desarrollo del tumor (Schiffman, 1993; Muñoz, 1993a; Muñoz, 1993b; Campion, 1995), por lo que una hipótesis probable de interacción de todos estos factores es propuesta por Nubia Muñoz (1993a) argumentando que el papilomavirus estaría actuando durante los primeros estadios del proceso

carcinogénico (por infecciones en la adolescencia o múltiples parejas sexuales), mientras que los factores hormonales (asociados a uso de anticonceptivos orales y paridad) actuarían en los estadios tardíos.

## **PAPILOMAVIRUS HUMANO Y CANCER CERVICOUTERINO**

Son varios los agentes de transmisión sexual que han sido implicados, en diferentes momentos, en la etiología del cáncer del cérvix. Sin embargo actualmente se considera al Virus del Papiloma Humano (VPH) como el agente más importante. El papilomavirus ha sido propuesto desde hace aproximadamente 20 años como el factor etiológico más importante en el cáncer cervicouterino. Varios estudios han mostrado la fuerte asociación entre el cáncer cervical y la presencia de ADN del VPH (Zur Hausen, 1977; Boshart, 1984; Schwarz, 1985; Bosch *et al.* 1992; Bosch *et al.* 1995).

Recientemente se han tenido considerables avances para entender el mecanismo molecular por el cual ciertos tipos de virus pueden contribuir a la transformación maligna (Werness, 1990; Bosch, 1992; Muñoz, 1994; Werness, 1995; Zur Hausen, 2000). Pero, la relación entre transformación neoplásica e infección por VPH no es directa, y aún no son claros los mecanismos por los cuales la infección oculta evoluciona hasta una lesión intraepitelial, que posteriormente progresa (en algunos pacientes) a cáncer invasor.

## **PROPIEDADES DE LOS PAPILOMAVIRUS**

Los Papilomavirus son estrictamente epiteliotrópicos e inducen proliferaciones epiteliales y fibroepiteliales benignas y malignas de la piel y mucosas en humanos y varias especies animales.

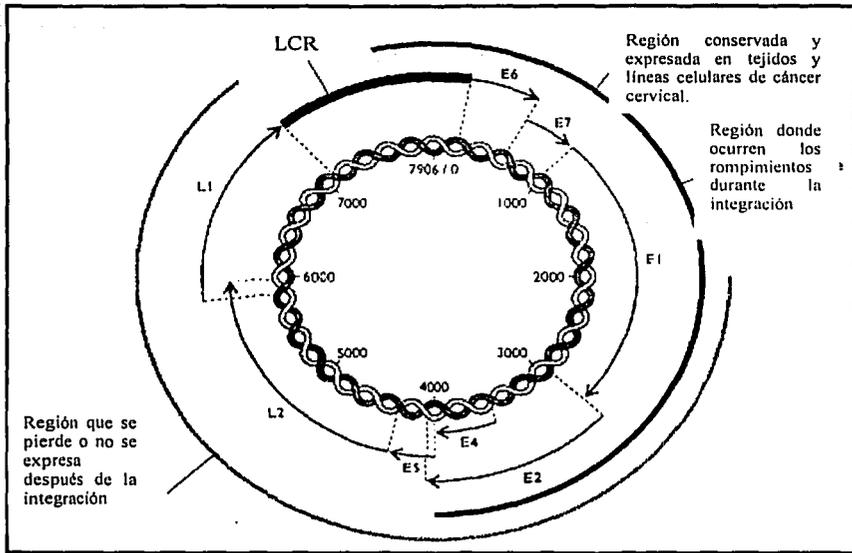
Son pequeños virus de ADN sin envoltura clasificados dentro de la familia Papovaviridae, su genoma consiste 7200-8000 pares de bases de ADN circular de doble

cadena que se divide en tres regiones importantes (**Figura 3**): una región temprana (E), la cual codifica las proteínas virales necesarias para la replicación del ADN viral, la regulación de la transcripción y la transformación e inmortalización celular; una región tardía (L) que codifica proteínas estructurales, y una región reguladora conocida como región larga de control (LCR) que contiene las secuencias de ADN que permiten el control de la replicación y de la expresión del genoma viral (Seedorf *et al.* 1985; Cole *et al.* 1986; García-Carranca, 1993; Zur Hausen, 1996; Villa, 1997).

A pesar de su variedad, todos los Papilomavirus parecen compartir una organización genética similar, con ciertas diferencias tanto en las funciones de los genes virales, como en la regulación de su expresión (Mansur, 1993; Howley, 1996) (**Tabla 2**).

**Tabla 2: Función de distintas regiones del genoma de los VPH**

<u>Gen</u>	<u>Función y propiedades</u>
E1	Inicio de la replicación, actividad de helicasa y ATPasa, interacciona con E2 y modula la transcripción
E2	Regula la transcripción, auxiliar en la replicación viral, forma complejos con E1
E4	Desestabiliza estructuras de citoqueratinas
E5	Actividad transformante, asociada a membrana, interacción con factores de crecimiento y bombas de protones
E6	Inmortalizante, promueve la degradación de p53, activa la telomerasa
E7	Inmortalizante (transformante), se une al producto del gen de retinoblastoma, se une a p130 y c-jun, activa la transcripción
L1	Constituyente principal de la cápside
L2	Minoritaria de la cápside, ensamblaje de los viriones
LCR	Secuencias reguladoras de la transcripción temprana, contiene el origen de la replicación viral y elementos de respuesta a diversos factores, entre ellos hormonas y la proteína E2



**Figura 3:** Genoma de VPH 16. Presenta ADN de doble cadena con aproximadamente 8 Kb de longitud, su genoma tiene tres regiones básicas: Una región reguladora (LCR) que contiene los controles de la replicación y transcripción. Una región de genes que se expresan tempranamente (Proteínas E1, E2, E4, E5, E6, E7) los cuales participan en la activación de la transcripción, transformación y replicación. Por último una región de genes tardíos (L1, L2) responsables de la formación y maduración de las partículas virales. (Tomado de Robert D. Burk, Albert Einstein College of Medicine, Human Papillomavirus and the risk of cervical cancer, 12-23-96)

Aproximadamente cerca de 70 a 90 tipos de papilomavirus humanos han sido aislados y caracterizados. Sin embargo, debido a que no se cuenta con un sistema de clasificación serológica, los VPH han sido caracterizados de acuerdo a su genotipo y al potencial oncogénico que presenta cada uno de ellos, actualmente se acepta por definición que el ADN de cada tipo difiere en por lo menos un 10% de la secuencia nucleotídica de los genes E6, E7 y L1 de cualquier otro tipo viral conocido. Recientemente se ha observado que los distintos tipos de Papilomavirus presentan variaciones genéticas, cuando estas diferencias van del 10 al 2% se trata de un subtipo, y cuando las diferencias son menores al 2%, se considera una variante del tipo de referencia (Van Ranst, 1993; Zur Hausen, 1996; Lizano *et al.* 1998), muchos de los tipos identificados tienen tropismo por el epitelio

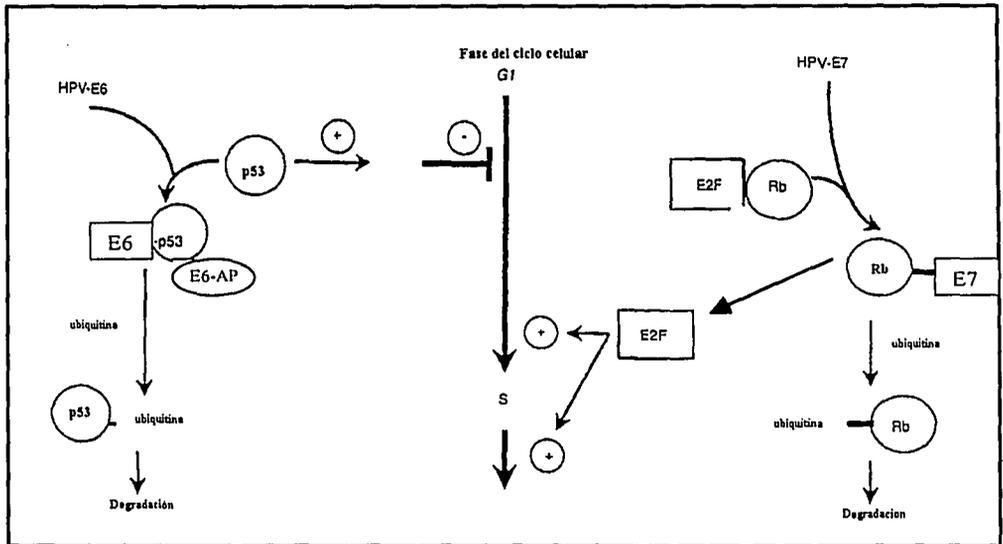
escamoso anogenital, de los cuales una parte son considerados de bajo riesgo (VPH 6, 11, 42, 44, etc.) por estar asociados a lesiones benignas como verrugas genitales; los tipos de alto riesgo (VPH16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 56, 58, etc.) inducen lesiones genitales más severas asociadas a cáncer genital.

Se ha reportado que en las lesiones precursoras benignas el ADN del VPH se encuentra en forma episomal, mientras que en los casos de cáncer el ADN viral está integrado al genoma celular (Zur Hausen, 1977; Schwarz, 1985; García-Carranca, 1993). Usualmente la integración ocurre en la región de los genes E1-E2 dando como resultado la pérdida de la integridad y la expresión del gen E2. Con esto la proteína E2 no puede reprimir al promotor de la transcripción de los genes E6 y E7 por lo cual estos genes se encuentran expresados en aquellas muestras de cáncer cervical positivas a los tipos 16 y 18 particularmente (Ham, 1991; Berumen, 1994).

Al parecer los genes E6 y E7 son los únicos factores virales necesarios para la inmortalización de las células epiteliales genitales. Estas dos proteínas forman complejos con proteínas reguladoras del hospedero como p53 y pRb (Zur Hausen, 1977). El gen E6 de los VPH de alto riesgo se une a p53 y de manera indirecta causa su degradación y de este modo evita que realice su función normal de responder a los daños causados en el ADN (Wernes *et al.* 1990), ya sea por radiaciones o mutágenos químicos, sin esta unión, los niveles de p53 pueden incrementarse y detener el crecimiento celular, para reparar el daño ocasionado al ADN o llevar a la célula a la apoptosis.

E7 por su parte, puede unirse a varias proteínas celulares, incluyendo pRb. Esta interacción puede inactivar la función normal de pRb y enviar al ciclo celular a la fase S e inducir la síntesis de ADN. Es decir, pRb en su función supresora se encuentra no fosforilada y unida al factor de transcripción E2F-1; al unirse E7 a pRb, el factor E2F-1 se libera y promueve la transcripción de genes dependientes de él (Mansur, 1993; Howley, 1996; Lazo, 1999). También, se ha propuesto que la proteína E7 de VPH 16 induce la degradación de Rb por la vía de ubiquitina-proteosoma (Boyer, 1996) (**Figura 4**).

Cabe mencionar que otros factores necesariamente tienen que estar involucrados en el mecanismo de progresión hacia un cáncer invasor, como serían los oncogenes *myc* y *ras*, ya que sólo un pequeño porcentaje de mujeres infectadas con VPH de alto riesgo desarrollan cáncer (DiSaia, 1997; Rhoda, 1998).



**Figura 4:** Efecto dual de las proteínas E6 y E7 de VPH en el ciclo celular. Posible mecanismo por el cual se puede explicar los estados de deficiencia de las proteínas supresoras de tumores p53 y pRb en una neoplasia cervical (Modificado de: Lazo PA, 1999)

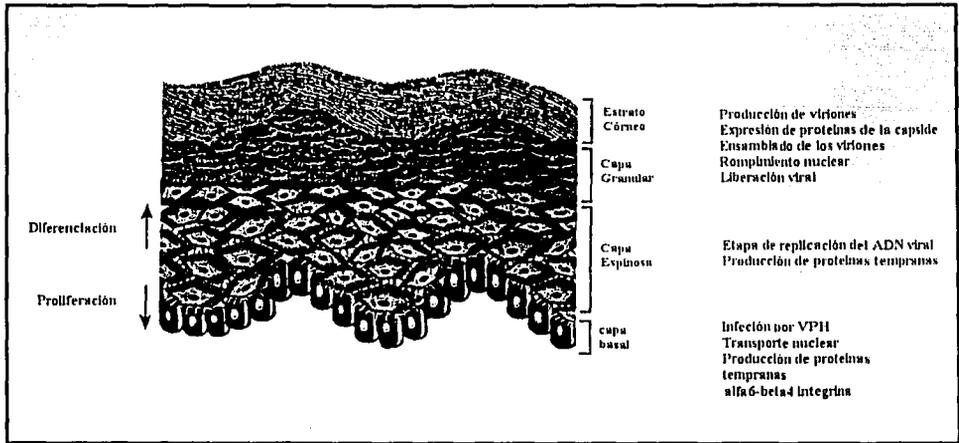
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CICLO VITAL DE LOS PAPILOMAVIRUS

Se dice que los papilomavirus son altamente especie-específicos e inducen lesiones epiteliales escamosas y fibroepiteliales en sus hospederos naturales. Se ha postulado que el ciclo replicativo del virus está en sincronía con la diferenciación del epitelio, en particular de los queratinocitos (**figura 5a**) (Werness, 1995; Howley, 1996).

Sin embargo, un receptor viral en la célula hospedera no ha sido identificado en forma definitiva, un dato reciente sugiere que un receptor candidato puede ser la integrina  $\alpha 6\beta 4$  de los queratinocitos basales (Rhoda, 1998). Durante la infección del epitelio cervical, el VPH sólo infecta a las células que pueden dividirse (las células basales), estas células en condiciones indiferenciadas no permiten que el virus se replique y éste permanece en forma latente. A medida que se diferencian las células, el virus se replica, se transcribe y forma partículas virales completas que son liberadas con el recambio del epitelio diferenciado (García-Carranca, 1993; Roden, 1994; Werness, 1995; Rhoda, 1998).

Con técnicas de hibridación *in situ* se ha podido seguir la distribución de Papilomavirus en el epitelio cervical (Howley, 1996; Meyers, 1997), observándose la expresión de genes tardíos en las células epiteliales más diferenciadas. También con hibridación *in situ* se analizó la expresión del ARN del VPH 16 en lesiones cervicales premalignas de diferente grado de severidad a fin de encontrar diferencias en la distribución del ARN viral. Con ello se encontró que en las capas basales de una lesión intraepitelial escamosa de bajo grado, se transcriben genes tempranos E1, E2. Además de que la intensidad de la señal aumenta considerablemente en las células más diferenciadas y al mismo tiempo se registran altos niveles de replicación del ADN viral (Dürst, 1992).



**Figura 5a:** Ciclo de vida de Papilomavirus humano dentro del epitelio escamoso estratificado. El virus infecta las células basales del epitelio, que proliferan activamente. Conforme se diferencian las células, el virus se replica, se transcribe y forma partículas virales completas que se liberan con el recambio del epitelio diferenciado (Modificado de: Rhoda, 1998)

Aunque el conocimiento acerca del ciclo de vida de los papilomavirus es muy limitado en cuanto a los pasos iniciales de la replicación, se puede deducir que en el proceso se distinguen tres etapas (**Figura 5b**):

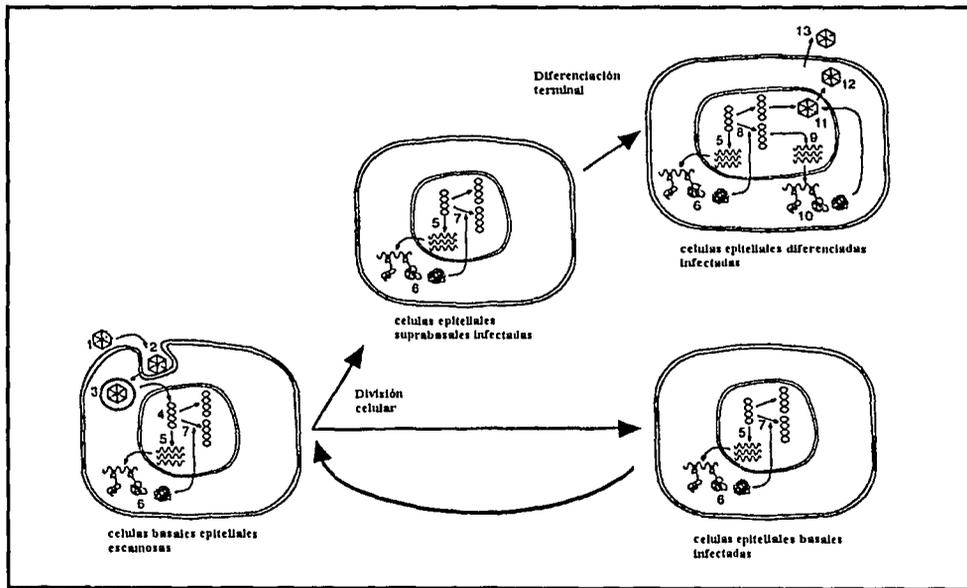
A) *Amplificación transitoria o de establecimiento.* En ésta, el genoma viral infectante se amplifica desde bajo hasta moderado número de copias de aproximadamente 50-200 copias por célula.

B) *Etapa de mantenimiento o replicación vegetativa.* Es decir, que en las divisiones celulares sucesivas el número de copias del ADN viral se mantiene estable mediante una replicación regulada y acoplada a la fase "S" del ciclo celular; ambas etapas ocurren a nivel de células basales y suprabasales.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

C) *Etapa de multiplicación masiva del genoma viral.* Aquí ocurre la síntesis de las proteínas de la cápside y la maduración viral, con la subsiguiente liberación de las partículas infecciosas por la descamación de los queratinocitos hospederos terminalmente diferenciados. Esto sucede generalmente en las capas superficiales córneas del epitelio, en las cuales el ADN celular ya no se replica (Howley, 1996; Rhoda, 1998).

Estos eventos señalan que posiblemente las modificaciones dentro de la célula hospedera, producen señales que pueden modular la expresión de los genes virales responsables de su replicación y maduración. Lo que refuerza la teoría de que la diferenciación epitelial es indispensable en la producción y maduración de las partículas virales infectantes (Meyers, 1997).



**Figura 5b:** Ciclo replicativo de Papilomavirus. El conocimiento acerca de los pasos iniciales del ciclo replicativo del virus es totalmente limitado, pero se podría esquematizar como sigue: (1) fijación del virus a la membrana celular, (2) entrada del virus, (3) endocitosis, (4) transporte del ADN viral al núcleo, (5) transcripción de los genes tempranos, (6) traducción de las proteínas tempranas, (7) fase de replicación viral. Los siguientes eventos ocurren en los queratinocitos totalmente diferenciados, (8) replicación vegetativa del ADN viral, (9) transcripción de los genes tardíos, (10) producción de las proteínas de la cápside L1 y L2, (11) ensamblado de las partículas virales, (12) rompimiento nuclear, y (13) liberación de nuevos virus infectantes. (Adaptado de Fields Virology, third edition, 1996, cap.65, by B.N.Fields, D.M. Knipe *et al.*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia)

## **VPH Y CANCER: HISTORIA NATURAL DE LA INFECCION**

El Papilomavirus Humano es un virus transmitido sexualmente que ha sido estudiado de primera instancia en el contexto de su papel como el principal factor de riesgo epidemiológico para cáncer cervical y como agente biológico capaz de modificar el crecimiento y diferenciación celular. Por este motivo, muchos son los estudios que se han realizado para esclarecer la participación del papilomavirus en el desarrollo del cáncer cervical, sin embargo, poco se sabe acerca de la historia natural de la infección.

En pacientes con enfermedad aparente, la infección por VPH puede presentar diferentes manifestaciones clínicas incluyendo condiloma acuminado, condiloma plano, condiloma gigante y verrugas abultadas. La historia natural de la infección por VPH esta marcada por un curso fluctuante y variable, de lesiones visibles, latencia y recurrencia. Algunos casos regresan espontáneamente, otros persisten y todavía otros aparecen después de la terapia, también en raras ocasiones la lesión progresa a malignidad. El tipo viral involucrado tiene un efecto significativo en la progresión de la enfermedad, de igual manera, el estado inmunológico del hospedero es un determinante importante en el curso de la enfermedad, entre otros factores que de una u otra forma parecen alterar el curso de la historia natural de la infección (Kiviat, 1993; Morrison, 1994; Beutner, 1997; Handsfield, 1997; Ho *et al.* 1998).

### **Transmisión**

Las infecciones genitales por VPH son primariamente transmitidas por contacto sexual, en los sitios del epitelio que presente microtrauma o alguna maceración. Otros medios de transmisión igualmente importantes son a través del material médico, fomites y durante el nacimiento de un niño por una mamá infectada (Morrison, 1994; Zur Hausen, 1996; Handsfield, 1997).

Campion (1995), describe el curso de la infección de la siguiente manera: (Figura 6)

**Fase de Incubación.** En el sitio de entrada, el ADN del VPH es trasladado al núcleo y se transcribe, produciendo proteínas transformadas que alteran a la célula huésped. Mientras que las proteínas reguladoras controlan la expresión de los genes virales. Se producen entonces, copias múltiples del genoma viral que gradualmente se propagan a las células vecinas, estableciendo una infección latente que puede durar por lo menos 8 meses (Ylitalo *et al.* 2000). En la infección latente el genoma viral persiste pero no se producen partículas infecciosas y por lo tanto la célula no es destruida. Algunos de los genes virales tempranos pueden ser expresados durante esta fase, aunque no todos y puede ocurrir una reactivación de alguna infección productiva establecida con anterioridad (Morrison, 1994).

**Fase de Expresión Activa.** La infección latente por VPH puede progresar a una expresión viral activa en algunos sitios particulares. En este caso, se presenta una proliferación rápida del epitelio, de los capilares, y las proyecciones del estroma con extenso crecimiento vascular pueden ser visibles en la forma de un papiloma exofítico. Pero si el crecimiento capilar no es suficiente para producir una verruga, la lesión permanecerá subclínica, la cual puede ser reconocida colposcópicamente después de la aplicación de ácido acético al 5% (Handsfield, 1997).

**Fase de Represión del Huésped.** Después de aparecer alguna lesión clínica o subclínica, el huésped desarrolla una respuesta inmunológica celular para su defensa. Durante la fase de represión, los condilomas clínicos pueden revertir espontáneamente hasta en un 20% de los individuos infectados (Zur Hausen, 2000).

**Fase Tardía.** Se observan dos grupos: aquellas pacientes que permanecen en una remisión clínica sostenida y las que recaen después de un intervalo libre de enfermedad y continúan con una fase de expresión activa del virus. En este último grupo existe mucha probabilidad de que las lesiones progresen hacia la malignidad, particularmente si el tipo viral presente es del grupo de alto riesgo (VPH 16 o VPH 18) (Villa, 1997).

La persistencia continua del ADN viral y el hecho de que se transcribe activamente en las células premalignas y malignas resulta altamente sugestivo de su papel en el mantenimiento de la neoplasia (Ikenberg *et al.* 1994). Sin embargo no debemos excluir la participación de otros factores, actuando sinérgicamente en el desarrollo del cáncer cervical, que es multifactorial y un proceso de múltiples etapas, (**figura 7**) (Schneider and Koutsky, 1992).

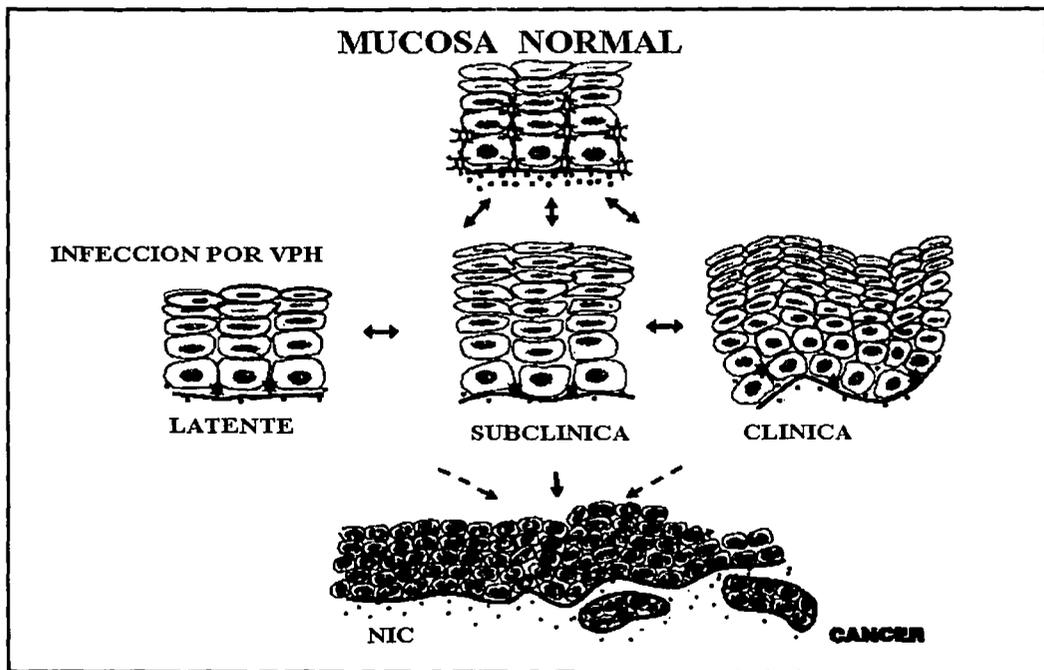


Figura 6: Curso de la infección por VPH. a) Fase de incubación, se producen múltiples copias del genoma viral que se propagan a las células vecinas. b) Infección latente, el genoma viral persiste pero no hay partículas infecciosas y la célula no se destruye. c) Infección subclínica, se presenta una proliferación rápida del epitelio y de los capilares, formando lo que conocemos como verruga. d) Infección clínica, el huésped desarrolla una respuesta inmunológica celular para su defensa. En este último paso existe la probabilidad de que las lesiones progresen hacia la malignidad, principalmente si el tipo viral presente es de alto riesgo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Con base en lo anterior, existe una enorme necesidad de contar con un marcador que pueda definir la historia natural de las lesiones premalignas (NIC) y detectar la verdadera lesión precursora. En varios estudios relacionados con la persistencia de VPH en las lesiones premalignas, se muestra que las mujeres negativas para el virus, o con un Pap normal o alguna infección con VPH de bajo riesgo, no hay progresión de la enfermedad. Por el contrario, en aquellas pacientes con persistencia de virus de alto riesgo, desde la primera toma de Pap mostraron progresión de la lesión premaligna hacia cáncer invasor (Cuzick *et al.* 1993; Remmink *et al.* 1995; Josefsson *et al.* 2000). En otro estudio en que se realizó un seguimiento a 36 meses en estudiantes universitarias (Ho *et al.* 1998), se reportó que el tiempo promedio de infección por VPH fue de 8 meses, y que 24 meses después, sólo un 9% continuaban infectadas. En ese trabajo concluyen que los factores de riesgo para una infección persistente por VPH son edad avanzada, infección con múltiples tipos de VPH, infección con tipos de alto riesgo, y múltiples parejas sexuales, entre otras.

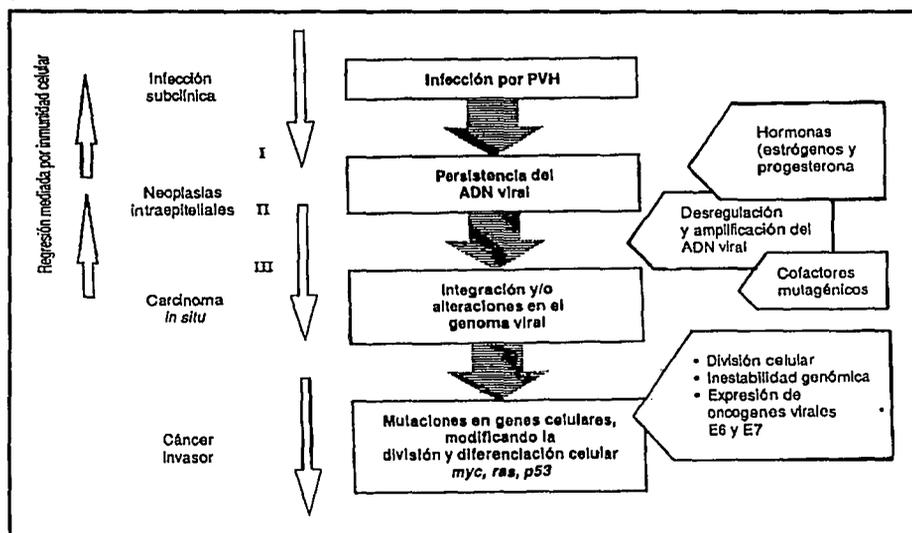


Figura 7: Se muestra la correlación entre los eventos clínicos (izquierda), moleculares (centro) y los cofactores asociados al desarrollo del CaCu (derecha), estos cofactores pueden afectar la patogénesis a diferentes niveles, lo que se muestra como un sobrelapamiento entre ellos y con los eventos a nivel molecular. Las flechas hacia arriba indican las fases clínicas susceptibles de regresión mediada por inmunidad celular. Las flechas hacia abajo muestran la progresión de la enfermedad (Tomado de: Gariglio *et al.* 1999).

## **OBJETIVO GENERAL**

Conocer la frecuencia y distribución de los tipos de Papiloma Virus Humano más frecuentemente asociados a neoplasias del cérvix en México, tanto en cáncer invasor, como en estadios premalignos, y en mujeres sanas.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar la presencia de VPH en mujeres mexicanas con cáncer invasor, lesión de alto grado (NIC II, NIC III), lesión de bajo grado (NIC I) y sanas, mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
2. Tipificar los VPH encontrados en las diferentes lesiones del cérvix por medio de secuenciación directa de los productos de PCR y el uso de oligonucleótidos específicos para VPH 16 y 18.
3. Determinar por medio de una prueba de concordancia (Kappa), si son comparables los muestreos mediante raspados cervicales y biopsia del cérvix de una misma mujer en cuanto a la detección de VPH.
4. Determinar si existe alguna asociación entre la distribución de VPH encontrada con la histología, la citología, la edad, la vida sexual y reproductiva de las mujeres en estudio.

## MATERIAL Y METODOS

Se colectaron un total de 185 muestras tomadas de mujeres mexicanas de cualquier edad, que asistieron a las siguientes unidades hospitalarias, para su atención: Instituto Nacional de Cancerología, Hospital General de México, Centro de Salud "Castro Villagrana" (IMSS) y la Clínica MEXFAM "La Villa", de enero a diciembre de 1995.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- a) casos incidentes de patología cervical premaligna y maligna (sin tratamiento previo).
- b) mujeres que asistieran para realizarse su prueba de Papanicolaou de rutina
- c) sin terapéutica antineoplásica o inmunomoduladora
- d) sin neoplasias previas en otra localización del cuerpo y
- e) que accedieran voluntariamente a participar en el estudio mediante firma de consentimiento informado.

Los criterios de exclusión fueron:

- a) pacientes con tratamiento previo
- b) pacientes con otro tumor diferente a CaCu
- c) que no accedieran a participar en el estudio

Las muestras fueron agrupadas como sigue:

- 44 casos de Cáncer Cervicouterino invasor
- 47 casos de Neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de alto y bajo grado
- 94 casos de mujeres con citología cervical normal

## **CUESTIONARIO**

Se elaboró un cuestionario para evaluar las características Gineco-obstétricas como: edad, conducta sexual, hábitos reproductivos y otras variables de interés. Este cuestionario fue aplicado a cada una de las pacientes mediante entrevista directa (encuestador / encuestado). Además el cuestionario cuenta con una hoja de consentimiento, la cual fue leída, comprendida y firmada por la paciente para aceptar participar en el estudio (ver apéndice).

## **MUESTRAS BIOLÓGICAS**

La toma de muestras biológicas de las mujeres se realizó después de un examen ginecológico y colposcópico minucioso, estas muestras consistieron de una biopsia y raspado cervical, de la siguiente manera:

### **a) En pacientes con cáncer cervicouterino**

- Raspado cervical, para diagnóstico de VPH por PCR
- Biopsia cervical, una parte para diagnóstico histológico y otra parte, para diagnóstico de VPH por PCR

(En estas pacientes, el diagnóstico lo da la histología y no el análisis del Papanicolaou, por lo cual, éste no se incluye).

### **b) En pacientes sin cáncer cervicouterino**

- Raspado cervical, para diagnóstico por Papanicolaou
- Colposcopia con ácido acético 5%
  - si es negativa, tomar un raspado cervical para diagnóstico de VPH por PCR
  - si es positiva, tomar además de un raspado cervical, una biopsia de la zona acetoblanca, para diagnóstico de VPH por histología y por PCR.

El diagnóstico citológico e histológico de todas las muestras incluidas en el estudio fueron interpretados por un solo citólogo y un solo patólogo del Instituto Nacional de Cancerología.

## **OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA**

**RASPADO CERVICAL:** Las muestras de endo y exocérnix fueron colocadas en un tubo de plástico cónico con 5 ml de solución PBS estéril. El tubo es agitado en vortex para desprender las células de la espátula, después se concentran por centrifugación a 3000 rpm por 10 minutos y se resuspenden en 1 ml de Tris.Cl 10 mM, pH 8; pasar a un tubo eppendorff, se centrifuga nuevamente a 13000 rpm 5 min., desechar el sobrenadante y finalmente se guardan a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento, debidamente etiquetadas.

**BIOPSIA CERVICAL:** Una vez que es extraída la biopsia se coloca en tubo eppendorff, se etiqueta y se mantiene en hielo hasta que es trasladada a un congelador de  $-70^{\circ}\text{C}$  y guardada para su procesamiento.

## **EXTRACCION Y PURIFICACION DEL ADN**

**RASPADO CERVICAL:** La muestra descongelada, se resuspende en 1 ml de Buffer de Lisis (Tris.Cl 10mM pH8, EDTA .1M pH8, SDS .5%, Proteínasa K 200ug/ml, RNAsa 20 ug/ml ), e incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  toda la noche (Sambrook *et al.* 1989).

**BIOPSIA CERVICAL:** Se toma una pequeña porción de la muestra, con una hoja de bisturí diferente para cada muestra, y se corta hasta disgregar el tejido, después se resuspende en un volumen total de 500 ul de Buffer de lisis (Tris.Cl 10 mM pH8, EDTA .1M pH8, SDS .5%, Proteínasa K 200ug/ml, RNAsa 20 ug/ml), e incubada a  $55^{\circ}\text{C}$  toda la noche (Sambrook *et al.* 1989).

La extracción del ADN en ambos tipos de muestras se realizó con fenol-cloroformo y precipitación con etanol, según la técnica descrita en Sambrook (1989).

## DETECCION Y TIPIFICACION DEL VPH

El diagnóstico de VPH se realizó mediante la técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR.) y el uso de diferentes juegos de oligonucleótidos universales (MY09/MY11, GP5/GP6; L1C1/L1C2) que amplifican fragmentos de diferente tamaño de la región L1 de Papilomavirus humano (**Figura 8**). Cada reacción se llevó a cabo en un termociclador modelo 480 (Perkin Elmer), en un total de 40 ciclos, un primer ciclo de desnaturalización a 94°C por 10 min. y un ciclo final a 72°C por 7 min. Las condiciones de temperatura y número de ciclos para el proceso de desnaturalización, alineamiento y extensión fueron diferentes con cada juego de oligonucleótidos utilizado. El resultado se visualizó por medio de electroforesis en gel de agarosa, identificando la banda amplificada del tamaño esperado.

### Montaje de la reacción

En cada reacción de PCR se incluyeron los siguientes controles:

- gen de  $\beta$ -globina
- contaminación (tubo con mezcla de reacción sin ADN)
- positivo (ADN de las líneas celulares HeLa y CaSki)
- negativo (ADN de la línea celular C-33)
- muestras a analizar

La mezcla de reacción se realizó en un volumen total de 20  $\mu$ l, que incluye dNTPs a 200mM (dATP, dGTP, dTTP, dCTP, GIBCO-BRL), Cloruro de magnesio 2mM, Buffer 10X PCR, Amplitaq Gold DNA polimerasa .4U (Perkin Elmer), 10 pM de cada oligonucleótido, agua estéril y de 100-200 ng de ADN celular.

### **Amplificación del gen de $\beta$ -globina**

Para comprobar que el material obtenido durante la extracción era adecuado para utilizarse en PCR, a todas las muestras se les amplificó un fragmento del gen de la  $\beta$ -globina (como control interno), que es un gen altamente conservado en los individuos. Se utilizó el siguiente par de oligonucleótidos:

GH20 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'

PC04 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'

Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento de aproximadamente 260-268 pb (Resnick *et al.* 1990). Las reacciones se sometieron a 40 ciclos de amplificación, bajo las siguientes condiciones: un primer ciclo de 10 min. a 94°C, 38 ciclos de 94°C por 40 seg., 55°C por 1 min., 72°C por 40 seg. y finalmente un ciclo de extensión a 72°C por 7 min.

### **Amplificación de la región L1 de Papilomavirus**

El ADN que se comprobó adecuado para la reacción de PCR (muestra  $\beta$ -globina positiva), fue utilizado para amplificar secuencias de VPH mediante una serie de oligonucleótidos universales que amplifican fragmentos de diferente tamaño de la región L1 de una amplia variedad de VPH.

A) Todas las muestras se amplificaron con los oligonucleótidos universales MY09/MY11, localizados dentro de la región L1 del genoma de VPH, dando un fragmento aproximado de 450 pb y son capaces de detectar más de veinticinco tipos virales (Resnick *et al.* 1990; Ting *et al.* 1990; Qu *et al.* 1997).

MY09 5'-CGT CCA AAA GGA AAC TGA GC-3'

MY11 5'-GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG-3'

Con las siguientes condiciones: 38 ciclos a 94°C por 40 seg., 55°C por 1 min., 72°C por 40 seg.

**B)** Todas las muestras que resultaron negativas a la amplificación con MY09/MY11 fueron sometidas a amplificación con los oligonucleótidos universales L1C1/L1C2, que generan un fragmento de 240-250 pb de la región L1 y detectan al menos nueve tipos virales genitales (6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 52 y 58) (Yoshikawa *et al.* 1990).

L1C1 5'-CGT AAA CGT TTT CCC TAT TTT TTT-3'

L1C2 5'-TAC CCT AAA TAC TCT GTA TTG-3'

Con las siguientes condiciones: 38 ciclos de 94°C por 40 seg., 48°C por 1 min., 72°C por 40 seg.

**C)** A su vez estas muestras también se analizaron, con otro par de oligonucleótidos universales (GP5/GP6), localizados dentro de la secuencia reconocida por los oligonucleótidos MY09/MY11, y amplifican un fragmento de 150 pb, los cuales pueden detectar los tipos virales 6, 11, 16, 18, 31, 33 y 32 (Van den Brule *et al.* 1990; Snijders, 1990; Qu *et al.* 1997).

GP5 5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3'

Gp6 5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3'

Las reacciones se sometieron a las mismas condiciones de amplificación utilizada para los oligonucleótidos universales L1C1/L1C2.

## DETERMINACION DEL TIPO DE VPH

La tipificación de las muestras positivas para VPH se realizó utilizando oligonucleótidos específicos para la región E6/E7 y LCR (región larga de control) de papilomavirus tipo 16 y 18, que son los más asociados a lesiones premalignas y malignas del cérvix (Muñoz *et al.* 1997).

Para esto se utilizaron los oligonucleótidos descritos por Berumen *et al.* 1994, que amplifican un fragmento de 792 pb de la región E6/E7 de VPH 16. La reacción se realizó bajo las mismas condiciones de amplificación descritas anteriormente, pero con una temperatura de alineamiento de 57°C.

16E6.1 5'-ATG CAC CAA AAG AGA ACT GC-3'

16E7.2 inv 5'-GGA TCA GCC ATG GTA GAT TA-3'

De la misma manera, se probaron oligonucleótidos modificados de Chi-Keong *et al.* 1993, que amplifican un fragmento de 350-360 pb de la región larga de control (LCR) de VPH 18 (Cole *et al.* 1986; Chi-keong *et al.* 1993), con el fin de asegurar la tipificación de este tipo viral.

LCR 18a 5'- TTT CGG TTG CCT TTG GCT TAT G-3'

LCR 18b 5'- CGG TTG CAT AAA CTA TGT AT-3'

### Secuenciación del ADN

Finalmente para determinar el tipo de VPH en todas aquellas muestras que no fueron VPH 16 ni VPH 18, se realizó la técnica de secuenciación directa (Sanger *et al.* 1977) de los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos generales, purificados por medio de Qiaex II (QIAGEN). Para la secuencia se utilizó el kit Thermo Sequenase radiolabeled Terminator Cycle Sequencing (Amersham Pharmacia Biotech) y marcaje con Fósforo 33 (Amersham Pharmacia Biotech), se realizó electroforesis en gel de acrilamida 8% más urea

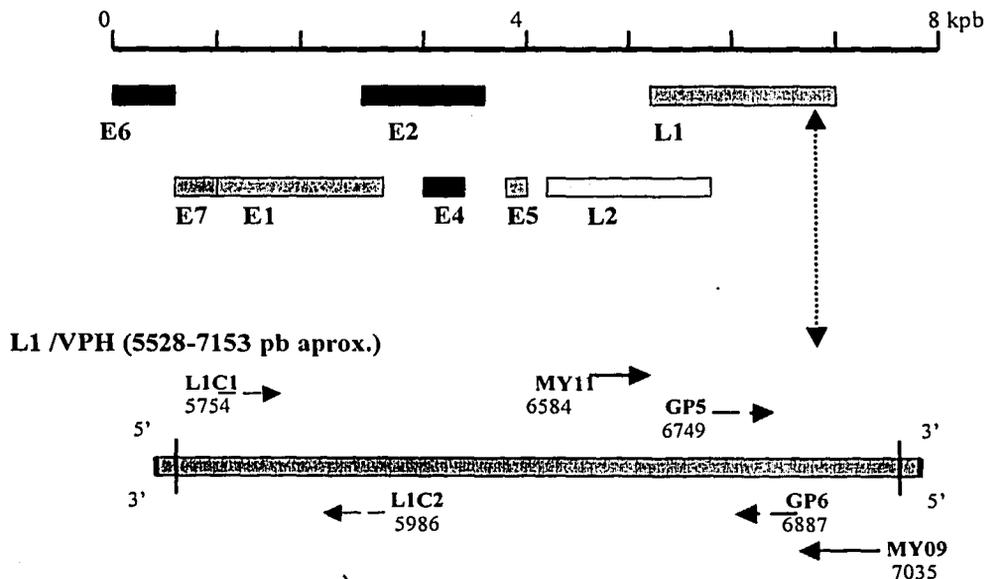
7M, a 1800 volts por 2 hr , la secuencia obtenida se metió a un banco de datos (BLAST) para su comparación con secuencias de ADN de VPH y determinar el tipo.

### ANALISIS ESTADISTICO

Para estudiar las posibles asociaciones de los parámetros clínicos y obstétricos con la presencia de VPH se utilizaron las pruebas "t student", "exacta de Fisher" y  $\chi^2$  de tendencia, según lo requiriera cada análisis (Zar Jerrold, 1984).

Para el análisis de concordancia entre la detección de VPH en biopsia y raspado cervical se utilizó la prueba estadística Kappa (Kelsey, 1986).

**Figura 8:** Organización simplificada (linealizada) del genoma de VPH tipo 16 y Representación esquemática de la posición en el genoma viral de los pares de oligonucleótidos utilizados en el estudio para amplificar la región L1 de VPH



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESULTADOS

Para este estudio fueron reclutados un total de 185 casos. El examen histo-citológico de los mismos reveló el siguiente diagnóstico: 44 casos de cáncer invasor del cérvix (CaCu), 47 casos de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y 94 casos con citologías normales. Todos los casos fueron diagnosticados por un sólo patólogo y un sólo citólogo.

De los 185 casos reclutados solamente 154 resultaron útiles para el diagnóstico de VPH por PCR (en 31 casos -la mayoría sanas- no se obtuvo amplificación del gen de  $\beta$ -globina). Las muestras fueron clasificadas de la siguiente manera:

### *65 casos de mujeres con citología normal ó alteraciones benignas*

- 33 con epitelio normal
- 24 con cervicitis
- 5 con metaplasia
- 3 muestras inadecuadas

### *45 casos de neoplasia intraepitelial cervical*

- 21 con lesiones de bajo grado/ NIC I
- 24 con lesiones de alto grado/ NIC II-NIC III

### *44 casos de CaCu Invasor*

- 36 Carcinomas epidermoides ( 13 queratinizantes y 23 no queratinizantes)
- 2 Adenocarcinomas
- 4 Adenoescamosos
- 2 Indiferenciados

La edad promedio de las pacientes ajustada por el tipo de lesión fue:

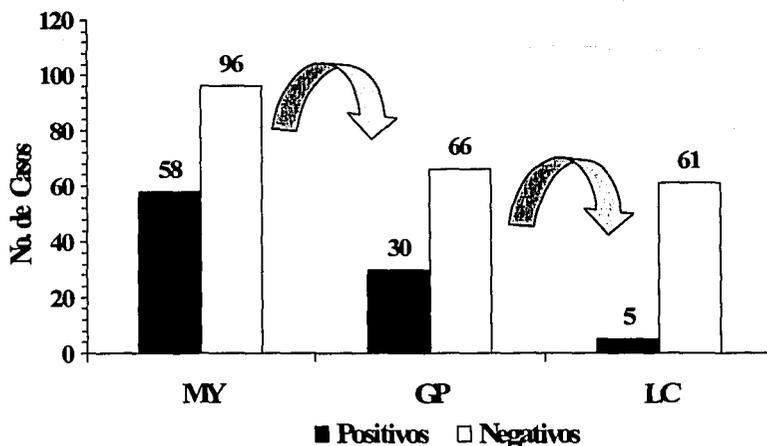
Sanas	37.8 años, intervalo (18-72 años)
Lesión de bajo grado (NIC I)	37.5 años, intervalo (22-57 años)
Lesión de alto grado (NIC II-III)	41.9 años, intervalo (19-77 años)
Cáncer Cervicouterino invasor	47.1 años, intervalo (26-74 años)

Se observó que las pacientes con CaCu invasor registraron mayor edad en comparación con los demás grupos ( $P < 0.05$ ), al aplicar una prueba de "t student".

#### **DETECCION DE ADN DEL VPH**

Se analizó la serie completa de 154 muestras que previamente fueron positivas para el gen de la  $\beta$ -globina, para determinar la presencia de VPH. Cabe aclarar que se realizó un ensayo previo de detección de VPH, usando extracto total de la muestra digerida con proteínasa K, sin embargo, no se logró una buena detección; por tal motivo se procedió a la purificación del ADN en todas las muestras.

La distribución de las muestras positivas según el sistema de oligonucleótidos utilizados se muestra en la **Gráfica 1**. Para este análisis se utilizaron tres diferentes juegos de oligonucleótidos universales (MY09/MY11; L1C1/L1C2; GP5/GP6) en la reacción de amplificación con PCR. Observando que 58 de 154 casos (38%), fueron positivas cuando se utilizó el par de oligonucleótidos MY09/MY11. Las 96 muestras negativas de este primer análisis fueron amplificadas con los oligonucleótidos GP5/GP6, dando un total de 30 muestras positivas, a las 66 muestras que siguieron negativas se les amplificó con los oligonucleótidos L1C1/L1C2, en donde se obtuvieron 5 nuevas muestras positivas. Finalmente en 93 casos (60.4%) de las 154 muestras analizadas, se detectó el ADN de algún tipo de VPH, quedando un total de 61 muestras negativas al virus.



**Gráfica 1:** Número de muestras positivas y Negativas a VPH de acuerdo al par de oligonucleótidos utilizado en la detección.

Por otra parte, en aquellas muestras positivas al virus, y que se tenía material suficiente para efectuar el análisis (más de 2 ug de ADN), se realizó la detección de VPH utilizando los tres sistemas de oligonucleótidos universales (MY09/MY11, GP5/GP6, L1C1/L1C2). Cada una de las muestras fue sometida a los tres sistemas de PCR con el fin de determinar el porcentaje de relación entre ellos. Los resultados de las 49 muestras analizadas en estas condiciones se resumen en la **Figura 9**.

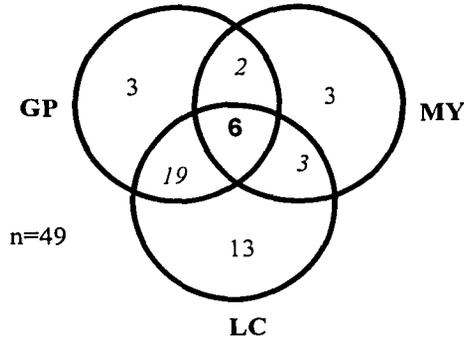
Se observa que un mayor número de muestras positivas, 41 de 49 (83.6%), se obtienen cuando se utiliza el par de oligonucleótidos L1C1/L1C2. Por su parte, con los GP5/GP6 se tuvieron 30 de 49 (61.2%) muestras positivas. Con los MY09/MY11 se tuvo un total de 14 muestras positivas al virus, lo que da un porcentaje de 28.5%

También se observa que 25 muestras fueron positivas tanto con los oligonucleótidos GP5/GP6 como con L1C1/L1C2, sugiriendo alguna posible relación entre los tipos virales que pueden detectar ambos. Finalmente un resultado positivo para VPH, con los tres juegos de oligonucleótidos utilizados se obtuvo sólo en 6 muestras.

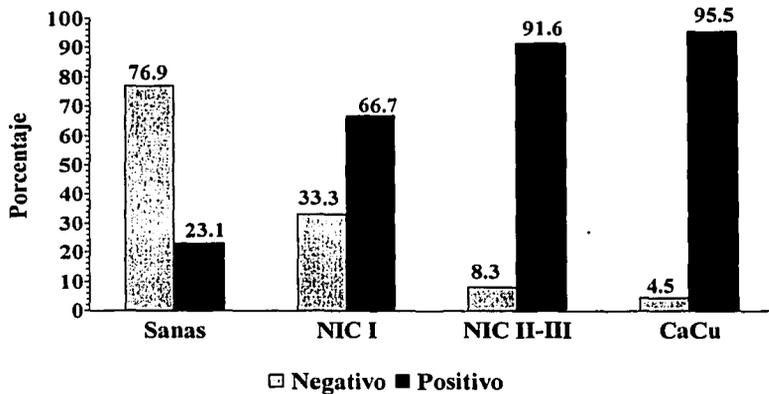
En la **Gráfica 2** se muestra el porcentaje de positividad a VPH en los cuatro grupos de muestras estudiadas, observando una clara tendencia al aumento de positividad al virus según avanza el grado de lesión de la enfermedad. El grupo de cáncer invasor presenta hasta un 95.5% de positividad, el grupo de mujeres con NIC II-III un 91.6%, en los casos de NIC I se encontró un 66.7% de positividad, mientras que, en el grupo de mujeres con estudio citológico normal fue del 23.1%. En estos datos se aplicó una prueba de  $X^2$  de Tendencia para determinar si el aumento en positividad a VPH, de acuerdo a la patología era estadísticamente significativo, obteniendo un valor de  $P=0.0001$ .

En las **figuras 10 y 11** se muestran algunos ejemplos de amplificación de un fragmento de la región L1 de VPH por PCR, con diferentes juegos de oligonucleótidos universales, incluyendo en cada prueba un control positivo (ADN de la línea celular CaSki), y un control negativo de la reacción (mezcla de reacción sin ADN).

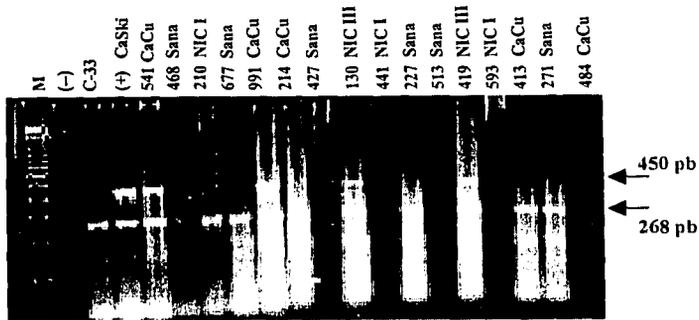
## DISTRIBUCION DE VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO



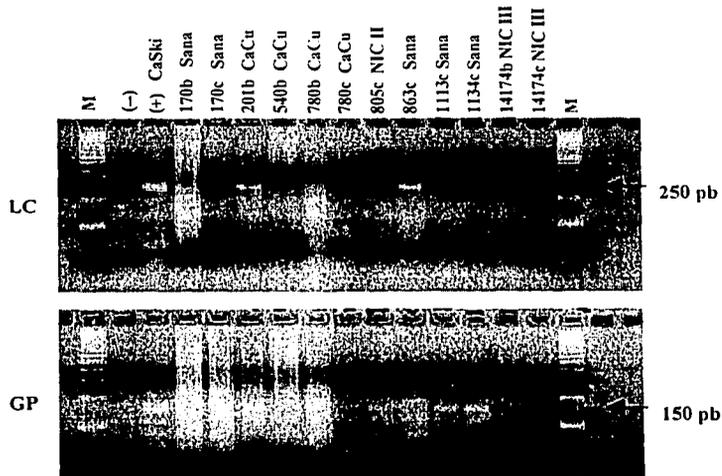
**Figura 9:** Resultados de 49 muestras sometidas a amplificación por PCR con los tres sistemas de oligonucleótidos utilizados en la detección de VPH.



**Gráfica 2:** Distribución del porcentaje de VPH encontrado en los 154 casos estudiados, agrupados de acuerdo al grado de lesión presentado al momento de la revisión médica. La detección de VPH se realizó mediante amplificación con PCR de un fragmento de la región L1 de VPH, utilizando diferentes juegos de oligonucleótidos universales.



**Figura 10:** Amplificación simultánea de un fragmento del gen  $\beta$ -globina (268 pb), así como, de un fragmento de la región L1 de VPH con oligonucleótidos universales MY09/MY11 (450 pb). (M) marcador de peso molecular de 100 pb, (--) control negativo, (+) control positivo (CaSki).



**Figura 11:** Amplificación de un fragmento de la región L1 de VPH con oligonucleótidos universales LIC1/LIC2 (250 pb) Y GP5/GP6 (150 pb). (M) marcador de peso molecular de 100 pb, (--) control negativo, (+) control positivo (CaSki). En las muestras analizadas b) Biopsia, c) Raspado cervical

## TIPIFICACION DE PAPILOMAVIRUS

En el **Cuadro 1**, se presenta la distribución de los tipos virales encontrados mediante el uso de oligonucleótidos específicos para los tipos 16 y 18, así como secuenciación directa de los productos de PCR, en los cuatro grupos de muestras estudiadas. Entre los VPH de alto riesgo se lograron detectar los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59 y 66, de los cuales el tipo 16 fue el que se encontró con mayor frecuencia (46.2%), seguido de VPH 18 (16%). Entre los tipos virales de riesgo intermedio, solamente se encontró VPH 51 en todos los grupos estudiados. En cuanto a los tipos virales de bajo riesgo fueron detectados el 6A, 11 y 44 sólo en mujeres sanas y lesiones de bajo grado (NIC I); también se encontraron dos VPH de riesgo desconocido (VPH 54 y VPH 61), en lesiones de bajo grado. Por último en cinco muestras positivas a VPH no se obtuvo el tipo específico debido a que el material fue insuficiente, reportándose como “no determinados”.

Al clasificar por riesgo oncogénico los tipos de VPH encontrados (**Gráfica 3**), se observó que los grupos de cáncer invasor y lesión de alto grado (NIC II-III) registraron un porcentaje mayor de positividad a VPH de alto riesgo (88% y 87% respectivamente), en comparación con el grupo de mujeres sanas y lesiones de bajo grado (NIC I), que registraron un 14% y un 31% respectivamente.

Debido a la particular importancia de los tipos virales 16 y 18 en la etiología del CaCu, analizamos su distribución en los diferentes estadios de lesión cervical (**Gráfica 4**). Observamos mayor positividad para estos tipos virales en las lesiones de alto grado y CaCu invasor (62.5% y 68.2% respectivamente). Es importante mencionar que los tipos 16 y 18 se presentan desde las lesiones más tempranas e incluso en mujeres con citología normal, aunque el porcentaje de positividad para estas últimas fue relativamente bajo (12.5%).

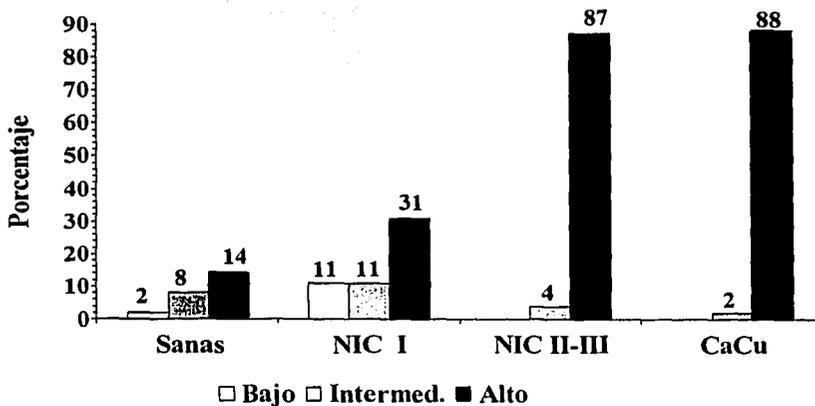
En el **Cuadro 2**, se describe el tipo histológico en las 44 muestras de cáncer cervicouterino invasor que se analizaron. De 42 casos positivos a VPH, 22 (52.4%) fueron clasificados como carcinoma epidermoide de células grandes no queratinizantes; 13 casos (31%) fueron carcinoma epidermoide de células grandes queratinizante; 4 casos (9.5%) adenoescamosos y 3 muestras correspondieron a tipos histológicos menos frecuentes.

***Tipos de VPH***

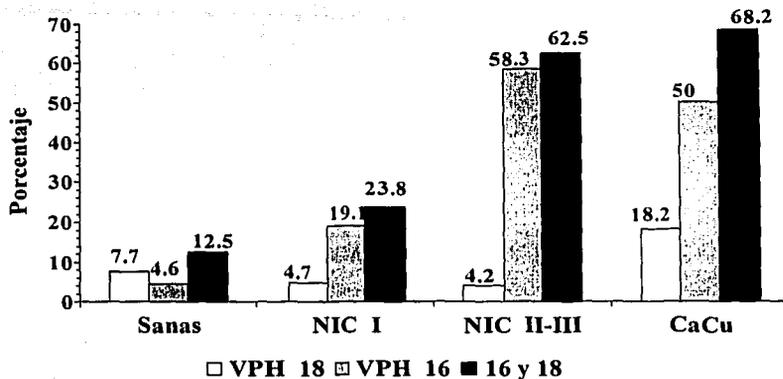
n	VPH-	VPH+	6	11	16	18	31	33	35	39	44	45	51	52	54	58	59	61	66	*ND
154	61	93	1	1	43	15	3	2	2	1	1	3	9	1	1	2	1	1	1	5

**Cuadro 1:** Distribución de los tipos de VPH encontrados. La tipificación se realizó con primers específicos para VPH 16 y 18; y secuenciación directa de los productos de PCR.

\* No se determino el tipo de VPH presente porque la muestra fue insuficiente para el análisis



**Gráfica 3:** Distribución de VPH por riesgo oncogénico, agrupados en tres categorías: bajo riesgo, riesgo intermedio y alto riesgo, de acuerdo al tipo de lesión



**Gráfica 4:** Distribución del porcentaje de VPH 16 y VPH 18 de acuerdo al tipo de lesión, así como la suma del porcentaje de ambos. La tipificación se realizó con oligonucleótidos específicos para cada uno de los tipos antes mencionados.

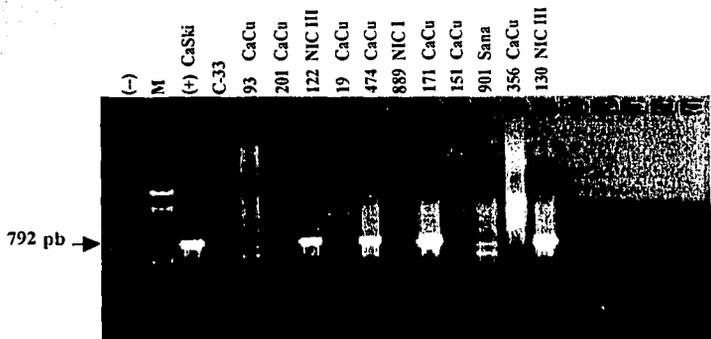
<i>Histología</i>	<i>n= 42</i>	
	<i>VPH +</i>	<i>%</i>
CECGNQ	22	52.4
CECGQ	13	31.0
Adenoescamoso	4	9.5
Adenocarcinoma	1	2.3
Indiferenciado	2	4.7

**Cuadro 2:** Tipo histológico de muestras de cáncer invasor positivas a VPH.

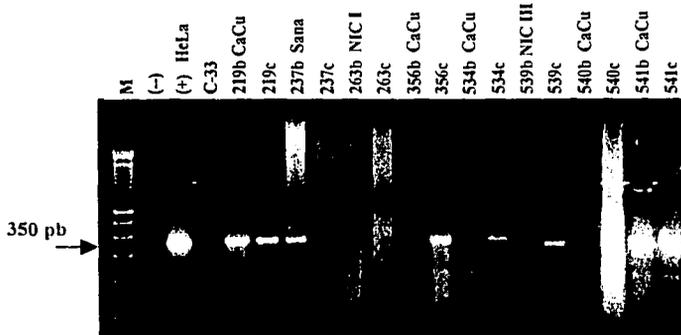
CECGNQ: Carcinoma Epidermoide de Células Grandes No Queratinizante  
 CECGQ: Carcinoma Epidermoide de Células Grandes Queratinizante

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Las **figuras 12 y 13** muestran ejemplos de amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos para los tipos 16 y 18. La **figura 14** muestra un ejemplo de secuenciación de un fragmento de ADN obtenido por PCR con oligonucleótidos universales MY09/MY11 y L1C1/L1C2.

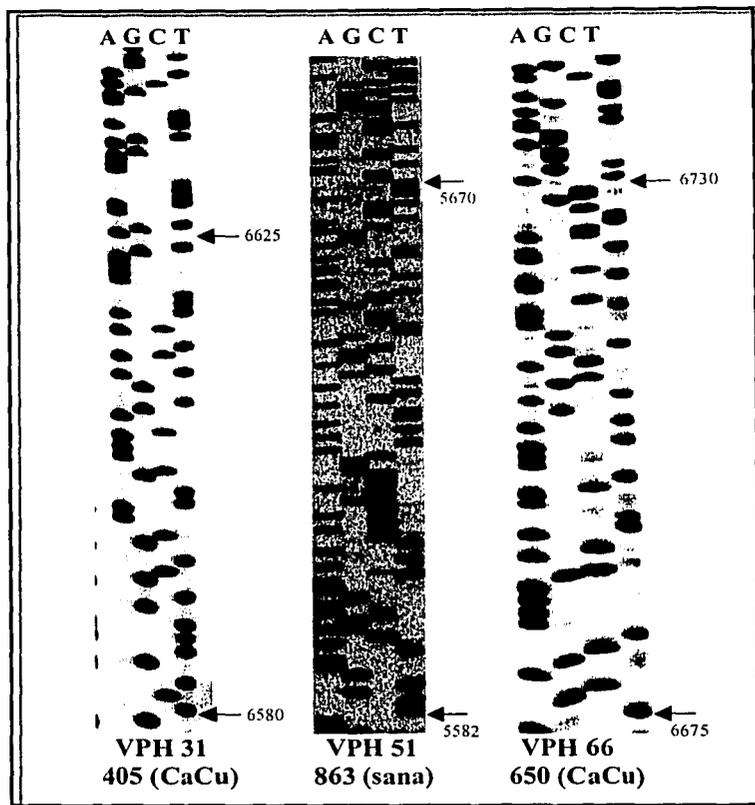


**Figura 12:** Amplificación de un fragmento de la región E6/E7 de VPH 16 con oligonucleótidos específicos (16E6.1/16E7.2inv). (--) control negativo de la reacción, (M) marcador de peso molecular de 100 pb, (+) control positivo (CaSki), (C33) control negativo.



**Figura 13:** Amplificación de un fragmento de la región LCR de VPH 18 con oligonucleótidos específicos (LCR18a/LCR18b). (M) marcador de peso molecular de 100 pb, (--) control negativo de la reacción, (+) control positivo (HeLa), (C33) control negativo. En las muestras analizadas b) Biopsia, c) Raspado cervical.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 14:** Ejemplos de secuencia de productos de PCR de muestras positivas a VPH con oligonucleótidos universales (LIC1/LIC2, sana; MY09/MY11, CaCu) ubicados dentro de la región L1. Para la secuencia se utilizó el kit de Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing (Amersham Pharmacia Biotech) y marcaje con fósforo 33.

### ADN DE VPH EN BIOPSIA Y RASPADO CERVICAL

En cuanto a la comparación de detectar VPH de acuerdo al tipo de muestra obtenida, se puede observar en el **Cuadro 3**, los datos de 91 pacientes (24 sanas, 11 con NIC I, 20 con NIC II-III y 36 con CaCu invasor), a quienes se les pudo tomar una muestra tanto de biopsia como de raspado cervical. Estos casos se agruparon de acuerdo a la condición de positividad para VPH.

LIBRO CON  
FALLA DE ORIGEN

En 55 casos (60.4%), la mayoría clasificadas como NIC II-III y CaCu invasor, tanto en la biopsia como en el raspado cervical se pudo detectar la presencia de ADN viral. En 22 casos (24.1%), en donde la biopsia y el raspado cervical fueron negativos a VPH, la mayoría fueron muestras de mujeres sanas. Un sólo caso fue positivo en el raspado cervical y no en la biopsia. Vemos con esto que la mayor sensibilidad para detectar VPH cae en las muestras obtenidas por biopsia (75%), mientras que en las muestras de raspado cervical hubo más negatividad.

Al determinar el valor de *kappa*, es decir, el grado de concordancia de los resultados (ya sea positivo o negativo a VPH) entre biopsia y raspado cervical, se obtuvo un valor de 65.25%, al aplicar la prueba estadística de *Kappa*.

Al calcular la sensibilidad y especificidad del método en cuanto a la detección de los verdaderos positivos y negativos a VPH en las muestras de raspado cervical se obtuvo un 81% y 96% respectivamente, esto es independiente del tipo de oligonucleótido utilizado en la amplificación.

CONDICION VPH	n / (%)	CONCORDANCIA
Biopsia (+) Rasp. (+)	55 (60.4)	65.25%
Biopsia (-) Rasp. (-)	22 (24.1)	
Biopsia (+) Rasp. (-)	13 (14.3)	
Biopsia (-) Rasp. (+)	1 (1.1)	
<b>Total de casos</b>	<b>91</b>	

**Cuadro 3:** Concordancia entre Biopsia y Raspado cervical para VPH. Se muestra la positividad encontrada tanto en muestras tomadas de Biopsia como de Raspado cervical en 91 mujeres, en las cuales se pudo obtener ambas muestras.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ANALISIS Y DISTRIBUCION DE LOS DATOS DE LA HISTORIA CLINICA

Con los datos obtenidos de la historia clínica se realizó la correlación entre los distintos parámetros. Para determinar la significancia estadística se aplicaron las pruebas de “t student”, “exacta de Fisher” y “ $\chi^2$  de tendencia”, de acuerdo al tipo de variable que se pretende comparar.

Para fines prácticos, las mujeres fueron clasificadas en tres grupos (Sanas, NIC's y CaCu invasor) de acuerdo al grado de lesión que presentaron al momento de la exploración física y la entrevista.

En la **Gráfica 5**, se muestra la distribución de la edad de las mujeres estudiadas por el grado de lesión cervical. Se puede observar que la mayoría de las mujeres con CaCu invasor se encuentran dentro de las edades comprendidas entre 30 a 39 años, esto aparenta ser una condición alarmante, dado que en mujeres muy jóvenes ya existe esta patología. Al igual que en el rango de edad de 50 a 59 años, que todavía son mujeres en edad productiva; finalmente hay un descenso hacia las edades mayores (69-80 años).

En cuanto a las lesiones premalignas de bajo y alto grado (NIC I, NIC II-III), se observa que existen desde edades muy jóvenes (menos de 29 años), lo que se mantiene sin cambios importantes a partir de los 30 a 60 años, y disminuye la frecuencia en edades más avanzadas.

El grupo de mujeres sanas registró edades desde 18 años hasta los 72 años, destacando la presencia de más mujeres en edad avanzada en el grupo de CaCu invasor.

Al comparar el promedio de edad entre el grupo de mujeres sanas y el grupo de CaCu invasor se encontró que sí hay diferencia significativa en cuanto a la edad en que se registró la patología ( $P < 0.05$ ), al aplicar una prueba de “t student”.

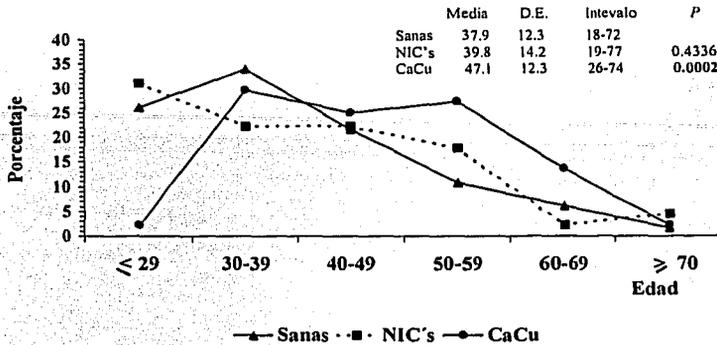
En la **Gráfica 6** se representa el nivel de escolaridad de las mujeres participantes. El 74.4% de las mujeres que presentaron CaCu invasor eran analfabetas o no habían concluido la primaria, además de que provenían de un nivel socioeconómico bajo. Esto es una característica de la población que en general asiste al Instituto Nacional de Cancerología, dado que es un hospital de concentración. Así mismo, las otras unidades hospitalarias de donde provienen nuestras muestras comparten características en cuanto a la población que allí se atiende. Cabe mencionar que solamente el 25% de las mujeres sanas tenían un nivel alto de escolaridad.

En cuanto a tabaquismo (**Gráfica 7**), se observó que en todos los estadios estudiados la mayoría de las mujeres no fumaba, de tal manera que en muestras de CaCu invasor, por ejemplo, el 81.8% no fumaban contra el 18.2% que sí fumaba, lo que nos hace suponer que en nuestra población de estudio, esta variable no parece ser un factor importante en la etiología de la infección por VPH y CaCu.

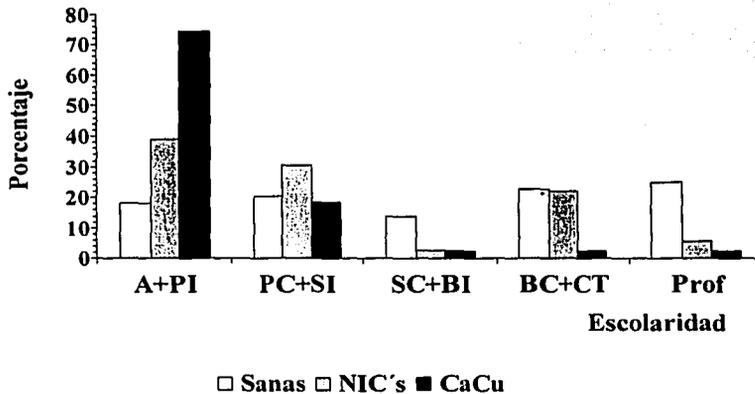
En la **Gráfica 8**, se registra el porcentaje de mujeres que se realizaron la prueba de Papanicolaou como un método de diagnóstico para descartar cáncer cervicouterino, agrupadas por el tipo de lesión. Se observa que en el grupo de mujeres sanas la prueba se la realizaron anualmente en la mayoría de los casos (87.6%); mientras que, en el grupo de mujeres que presentaron CaCu invasor nunca se realizaron la prueba, y solamente un 49% de ellas se la realizaron por única vez cuando ya presentaban manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Para el caso del grupo con NIC's los datos nos muestran un grupo heterogéneo donde hay un porcentaje similar de mujeres que si se realizan el Papanicolaou constantemente y aquellas que únicamente se lo hicieron para el diagnóstico de la enfermedad.

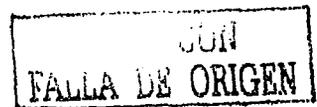
## DATOS DE HISTORIA CLINICA

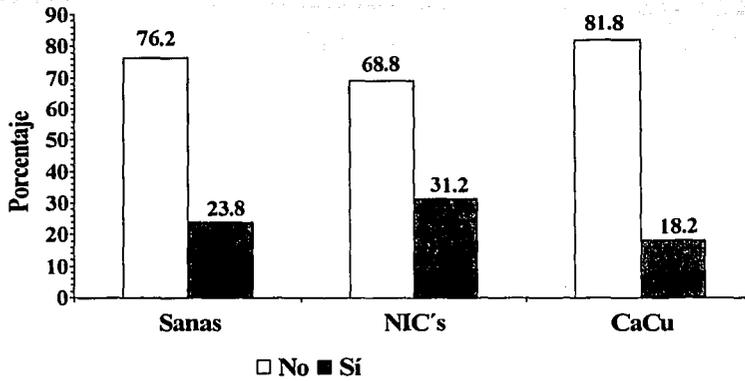


**Gráfica 5:** Distribución de la edad de acuerdo a los tres grupos analizados según el grado de lesión (Sanas, NIC's y CaCu invasor). Se presenta también el promedio, la desviación estándar, el intervalo de edad que comprende cada grupo, así como el valor de *P* cuando se compara la media de edad del grupo de mujeres sanas con el grupo de NIC's, y el grupo de mujeres sanas con el grupo de CaCu invasor.

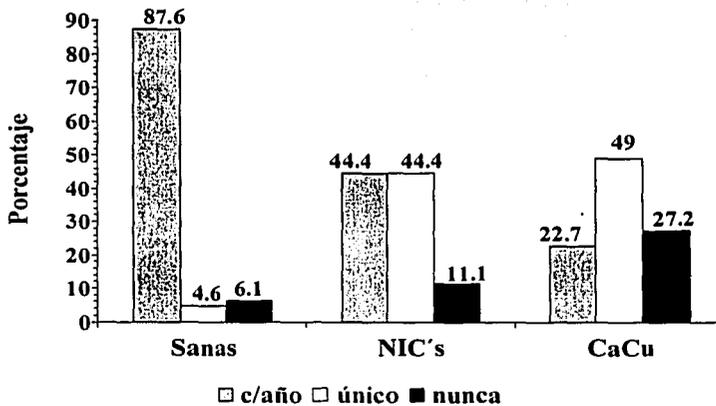


**Gráfica 6:** Distribución porcentual del nivel de escolaridad por tipo de lesión. Las iniciales de escolaridad son como sigue: A=analfabeta PI=primaria incompleta PC=primaria completa SI=secundaria incompleta SC=secundaria completa BI=bachillerato incompleto BC=bachillerato completo CT=carrera técnica Prof= Profesional.





**Gráfica 7:** Porcentaje de Tabaquismo, de acuerdo al grado de lesión.

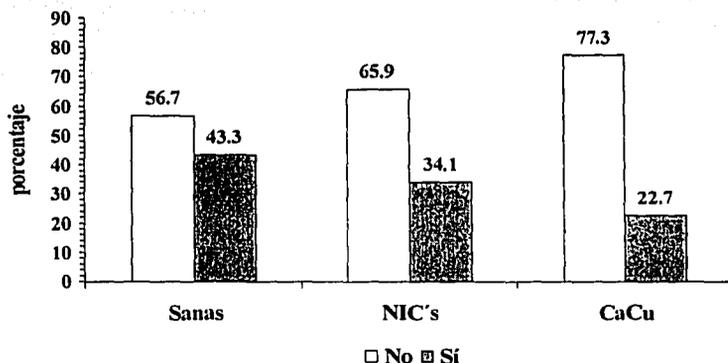


**Gráfica 8:** Frecuencia con que se realizaron el estudio de Papanicolaou, antes del diagnóstico definitivo.

FALLA DE ORIGEN

Los resultados muestran que la mayor proporción de utilización de Papanicolaou incide en mujeres que se encuentran en un bajo riesgo de enfermedad y, por el contrario la prevalencia de utilización por aquellas mujeres con mayor riesgo de enfermedad es baja. Esto también se correlaciona con el nivel de escolaridad que dijeron tener cada una de las mujeres participantes en el estudio.

En numerosos trabajos se habla de la asociación del uso de anticonceptivos orales (ACO) y el desarrollo de cáncer cervicouterino (Koutsky, 1997), sin embargo, en este trabajo no se encontró relación entre el uso de ACO con el grado de lesión y la presencia de infección por VPH. Como se observa en la **Gráfica 9**, del 56.7 al 77.3% de los casos de acuerdo al tipo de lesión no utilizaron anticonceptivos orales.



**Gráfica 9:** Porcentaje de mujeres que utilizaron anticonceptivos orales por lo menos de un período de seis meses o más, de acuerdo al grado de lesión.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ANÁLISIS Y DISTRIBUCIÓN DE LOS DATOS DE LA HISTORIA REPRODUCTIVA

En este apartado se relacionan los datos de la vida sexual y reproductiva de las mujeres en estudio con la infección por papilomavirus humano, para determinar el grado de asociación entre ambas partes con la presencia de lesión cervical. Las variables que se consideraron fueron: Menarca, Inicio de vida sexual activa, Intervalo de tiempo de maduración del epitelio cervical, Número de parejas sexuales, Embarazos, Abortos, Partos, entre otras.

Al realizar el análisis de los datos en cuanto a la edad de inicio de la primera menstruación (Menarca) de acuerdo al grado de lesión que presentaron las mujeres, encontramos que la mayoría tuvo un promedio de edad entre 12 y 13 años, sin encontrar alguna diferencia significativa entre cada estadio analizado (**Cuadro 4**).

Respecto a las variables ginecológicas, se ha encontrado que el factor de riesgo no reproductivo que se asocia más con CaCu invasor, es la edad de inicio de vida sexual activa (IVSA). En este estudio las mujeres sanas tuvieron una edad de inicio a los 20 años, mientras que para los casos con neoplasia intraepitelial cervical (NIC's) y CaCu invasor fue de 18 y 17 años respectivamente. Al comparar la media de edad del grupo sano contra NIC's y CaCu invasor, se encontró diferencia significativa en ambos casos (**Cuadro 4**) pero, no entre NIC's y CaCu invasor.

Por otro lado, se estableció una nueva variable, obtenida como resultado de restar a la edad de inicio de vida sexual activa (IVSA), la edad de inicio de primera menstruación (menarca), con el fin de establecer un lapso o periodo de tiempo durante el cual hubo maduración del epitelio cervical, denominándola Tiempo de Maduración del Epitelio Cervical (TME). Es decir, se estudio el tiempo que permaneció el epitelio sin tener contacto con agentes infecciosos transmitidos sexualmente, con el fin de ver si existe alguna relación con la presencia de VPH y el tipo de lesión cervical.

De esta manera los resultados mostraron que para el grupo de mujeres sanas el periodo de tiempo transcurrido entre los dos eventos (edad de primera menstruación e IVSA) fue de 7 años; para el grupo de NIC's de 5 años, y para el grupo de CaCu invasor de 4 años. Al aplicar la prueba estadística "t student" se encontró diferencia significativa entre las mujeres sanas al compararlas con el grupo de NIC's y CaCu invasor (**Cuadro 4**), lo que nos habla de un posible efecto de esta variable en la presencia de lesión cervical.

De igual forma se relacionó la edad del primer parto, la edad de inicio de vida sexual activa (IVSA) y el tiempo de maduración del epitelio cervical (TME), pero ahora con la presencia de infección viral (**Cuadro 5**), encontrando en todas ellas un resultado estadísticamente significativo menor a  $P < 0.05$ , lo que nos indica un posible efecto de estas variables con la presencia de infección por virus del papiloma humano con mayor frecuencia en mujeres muy jóvenes.

En cuanto al número de parejas sexuales, los resultados se muestran en las **Gráficas 10 y 11**. En la primera se hace una distribución del número de parejas sexuales por el tipo de lesión, donde se observa que en su mayoría la mujer mexicana tiende a tener una o dos parejas sexuales, lo que es independiente del grado de lesión que presentaron.

Al asociarlo con la presencia de VPH (**Gráfica 11**), encontramos que aquellas mujeres con más de 10 parejas sexuales tienen un elevado porcentaje de positividad al virus (100%), mientras que aquellas con sólo una o dos parejas sexuales y positivas a algún tipo viral, el porcentaje promedio fue del 58%.

## DATOS DE HISTORIA REPRODUCTIVA

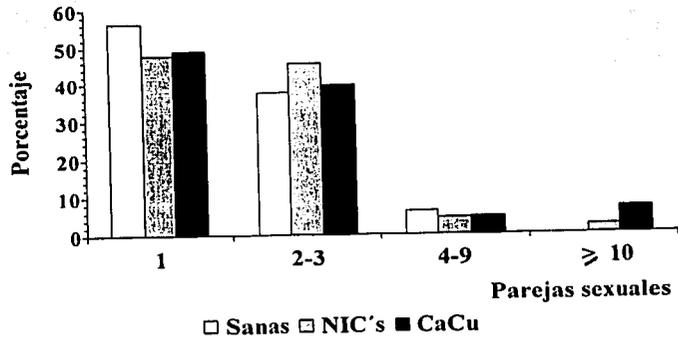
<b>Menarca</b>		
Sanas	NIC's	CaCu
	0.5060	0.1152
	NIC's	0.4327
<b>IVSA</b>		
Sanas	0.0390	0.0016
	NIC's	0.2312
<b>TME</b>		
Sanas	0.0330	0.0004
	NIC's	0.1095

**Cuadro 4:** Se muestra el valor de *P*, después de aplicar una prueba de "t student" a los datos de Menarca, inicio de vida sexual activa (IVSA) y el tiempo de maduración del epitelio cervical (TME), comparando al grupo de mujeres sanas contra el grupo de NIC's y CaCu invasor.

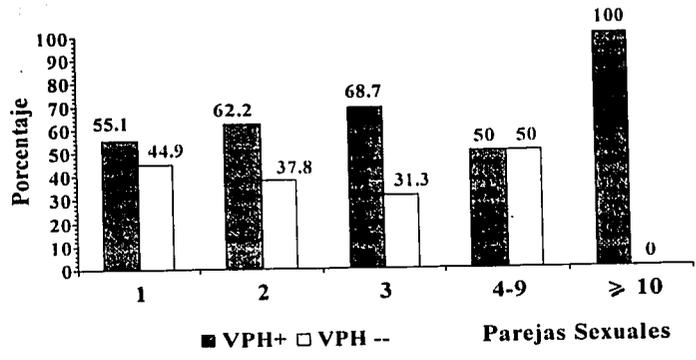
<b>Edad de IVSA</b>				
	Media	D.E.	Intervalo	<i>P</i>
VPH (+)	17.9	3.3	10-31	
VPH (-)	20.2	4.1	14-32	0.0002
<b>TME</b>				
VPH (+)	4.6	0.38	1-18	
VPH (-)	7.2	0.56	1-19	0.0004
<b>Edad del primer parto</b>				
VPH (+)	19.4	0.35	14-31	
VPH (-)	23.3	0.64	15-33	0.0001

**Cuadro 5:** Correlación del inicio de vida sexual activa (IVSA), el tiempo de maduración del epitelio cervical (TME) y edad del primer parto con la infección viral.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 10: Distribución del número de parejas sexuales. Se presentan los resultados de acuerdo al grado de lesión.



Gráfica 11: Distribución del porcentaje de VPH ajustado por el número de parejas sexuales

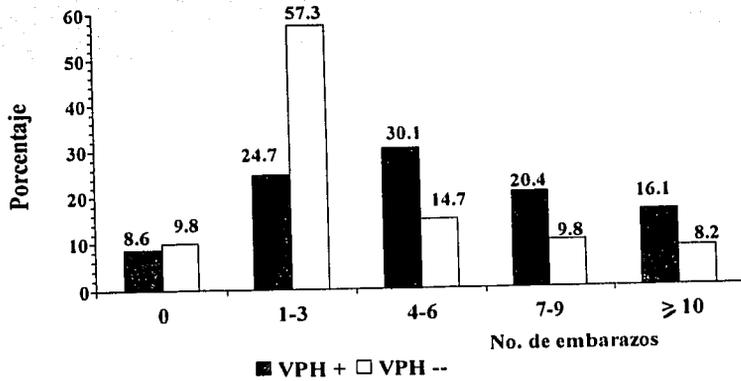
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

En cuanto al número de embarazos, en la **Gráfica 12**, se presenta la distribución del porcentaje de mujeres que fueron positivas a VPH ajustado por número de embarazos, donde observamos que un porcentaje importante de mujeres que son negativas al virus (57.3%), registró de uno a tres embarazos, por lo que, el resultado de un posible efecto en la infección por VPH y CaCu invasor no es claro, conforme aumenta el número de embarazos. Es decir, que el incremento en la proporción de mujeres infectadas por VPH no se modificó cuando se analizó de acuerdo al número de embarazos.

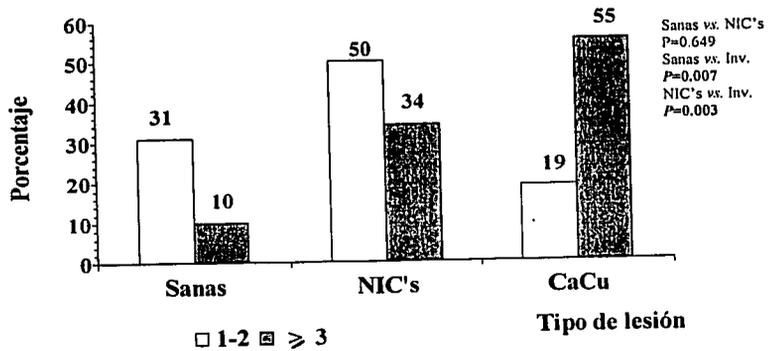
Sin embargo al realizar el análisis por el grado de lesión y presencia de infección viral (**Gráfica 13**), se encontró que el incremento en el número de embarazos no tiene efecto en el grupo de mujeres portadoras de NIC's al compararlas con el grupo de mujeres sanas, cuando se registró de uno a dos embarazos.

Pero al realizar la comparación del grupo de mujeres sanas con las que presentaron NIC's y CaCu invasor y que además registraron 3 o más embarazos, el resultado fue significativo ( $P=0.003$  y  $P=0.007$  respectivamente), lo que nos habla de un efecto importante de ésta variable sobre la presencia de enfermedad e infección por papilomavirus. Además, se realizó el mismo tipo de análisis para el caso de mujeres que fueron negativas al virus y no se encontró ninguna relación entre las variables.

En la **Gráfica 14**, se presenta la distribución del porcentaje de VPH ajustado por el número de abortos. Los resultados de este análisis no muestran algún efecto significativo en cuanto a infección por VPH, ya que encontramos igual porcentaje de mujeres positivas al virus que tuvieron más de dos abortos contra aquellas que no tuvieron ninguno, por lo que se propone que el aborto no es un factor que influya en la presencia de VPH en mujeres sanas. Esto mismo se presenta en aquellas mujeres que fueron negativas al virus.

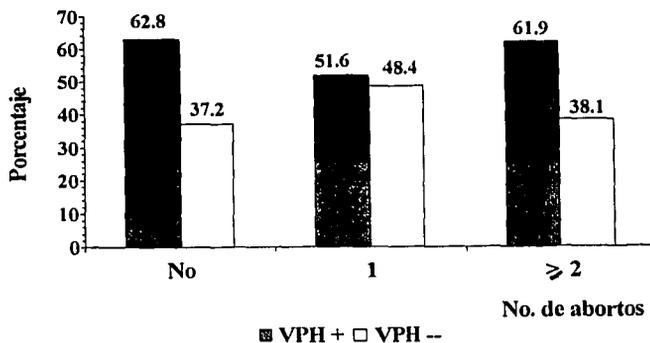


**Gráfica 12:** Distribución del porcentaje de VPH ajustado por número de embarazos



**Gráfica 13:** Distribución del número de embarazos por tipo de lesión, en mujeres positivas a VPH, y la comparación de la media entre sanas y NIC's; sanas y CaCu invasor; NIC's y CaCu invasor.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

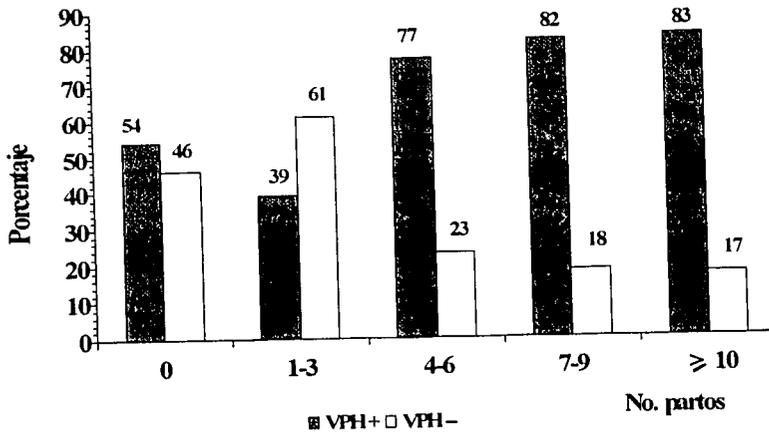


**Gráfica 14:** Distribución del porcentaje de VPH ajustado por el número de abortos

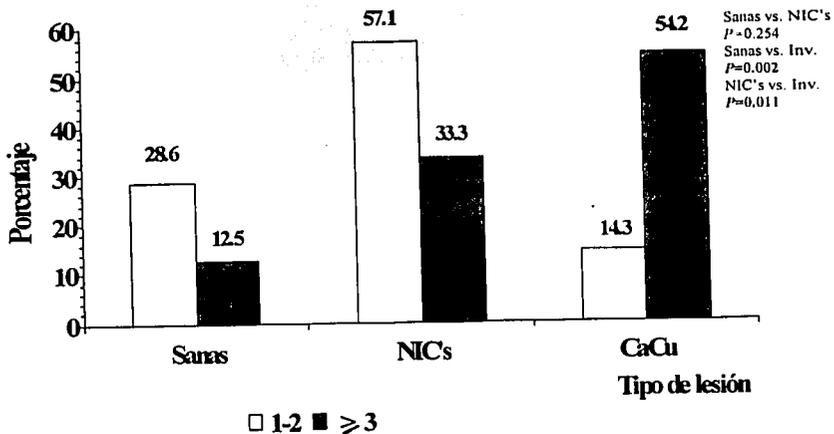
En cuanto al número de partos (embarazos llevados a termino), en la **Gráfica 15** se observa la distribución del porcentaje de VPH ajustado por el número de partos. Se distingue que hay un mayor porcentaje de mujeres positivas a papilomavirus que correlaciona con una mayor cantidad de partos, lo que nos estaría hablando de una posible asociación entre el número de partos y la infección viral. Sin embargo, el efecto no es muy marcado ya que a medida que aumenta el número de partos los porcentajes no difieren significativamente.

Posteriormente se relacionó la distribución del número de partos por el tipo de lesión en aquellas mujeres que fueron VPH positivas (**Gráfica 16**). Se determinó el nivel de significancia, al comparar cada uno de los grupos, clasificados por tipo de lesión. En este punto encontramos que aquellas mujeres que tuvieron tres o más partos y que fueron positivas a VPH, presentan mayor riesgo a desarrollar CaCu o alguna lesión de alto grado.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 15: Distribución del porcentaje de VPH ajustado por el número de partos



Gráfica 16: Distribución porcentual del número de partos agrupados por tipo de lesión en mujeres que fueron VPH positivas, presentando el valor de  $P$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DISCUSIÓN

En México, el cáncer cervicouterino constituye un problema de salud muy importante, por ser ésta la neoplasia maligna que ocupa los primeros lugares de morbilidad y mortalidad en la población (Mohar *et al.* 1997; Mohar *et al.* 2000). Los pocos trabajos publicados sobre la prevalencia del VPH han reportado cifras sumamente bajas de positividad al virus en cáncer cervicouterino (González-Garay *et al.* 1992; Ordóñez *et al.* 1993; Mendoza *et al.* 1994; Hernández *et al.* 1997; Zamora *et al.* 1998; Torroella *et al.* 1998b) y no hay información suficiente en especímenes de lesiones premalignas y en población de mujeres sanas. Estos pocos estudios generalmente emplearon técnicas de diagnóstico molecular poco sensibles y específicas que las utilizadas y aceptadas en la actualidad para estudios de epidemiología molecular y se limitaron básicamente a la detección de los tipos virales 16 y 18 (González-Garay *et al.* 1992; Berumen *et al.* 1994; Hernández *et al.* 1997).

Los resultados reportados en el presente trabajo ofrecen una visión de la frecuencia y distribución de VPH en México en muestras de cáncer cervicouterino invasor, lesiones premalignas de alto grado y bajo grado (NIC I, NIC II-III) y mujeres sanas, utilizando el sistema de reacción en cadena de la polimerasa con diferentes juegos de oligonucleótidos universales y específicos para detectar papilomavirus humano.

Con el uso de la técnica de PCR, se pueden detectar un gran número de genotipos de VPH que infectan la zona anogenital (Sarkar *et al.* 1990; Walboomers *et al.* 1999). Sin embargo, debido a que existen más de 70 tipos diferentes, de los cuales más de 30 tipos infectan la zona anogenital, es difícil establecer métodos para la detección de cada uno de ellos; por lo tanto algunas regiones específicas de VPH son utilizadas para construir oligonucleótidos consenso o universales, los cuales son capaces de amplificar varios tipos diferentes de VPH. Algunos autores han diseñado varios oligonucleótidos universales complementarios a la región L1 de VPH (Manos *et al.* 1989; Yoshikawa *et al.* 1990; Snijders *et al.* 1990), así como, para la región E6/E7 (Resnick *et al.* 1990).

Cabe mencionar que de primera instancia, en este estudio, se inició la detección de VPH utilizando un sólo juego de oligonucleótidos universales (MY09/MY11) en la reacción de amplificación con PCR. Con estos oligonucleótidos se obtuvo un 38% de muestras positivas al virus. Para aumentar el rango de detección de VPH, en las muestras previamente negativas, se decidió emplear otros dos juegos de oligonucleótidos que amplificaran diferentes fragmentos de la región L1 de VPH (L1C1/L1C2, GP5/GP6). Con esto se observó que con la combinación de estos tres juegos de oligonucleótidos se logra ampliar el rango de detección de VPH, como se ha descrito en algunos trabajos (Snijders, 1990) (ver. Gráfica 1). Ahora bien, de la amplificación realizada a 49 muestras positivas al virus con los tres juegos de oligonucleótidos (Figura 9), se pudo observar una mejor detección de VPH con L1C1/L1C2 (41 muestras) y GP5/GP6 (30 muestras), tanto en forma independiente como en forma combinada, en comparación con MY09/MY11. Consideramos entonces conveniente para trabajos futuros, utilizar a los oligonucleótidos L1C1/L1C2, en un primer análisis de detección y al resto de las muestras que resulten negativas, probarlas con GP's o MY's.

En otro trabajo, Husnjak (2000), hace énfasis de que el uso de oligonucleótidos MY/GP en la amplificación con PCR incrementa significativamente la detección de ADN de VPH, además de que puede ser utilizado en muestras con un bajo número de copias de ADN del virus. Además si consideramos que en la actualidad existen varios métodos para detectar ADN de VPH, como son: Southern blot, Dot blot, Hibridación *in situ*, PCR y Captura de híbridos (cada una de ellas con sensibilidades diferentes y con sus propias ventajas y desventajas), ahora es posible estimar la prevalencia real de VPH en diferentes poblaciones, sin temor a subestimarla (Trofatter, 1997; Cope *et al.* 1997; Peyton *et al.* 1998; Kuperman *et al.* 2000; McLachlin *et al.* 2000).

De acuerdo con reportes previos, se observó que el método de PCR basado en el uso de tres diferentes juegos de oligonucleótidos universales para detectar ADN de VPH en muestras cervicales tiene mayor sensibilidad en comparación con el método de Captura de Híbridos, ya que en el presente trabajo se obtuvo una positividad a VPH del 95.5% en muestras de cáncer invasor en comparación con el 87% obtenido por Torroella (1998b) al

utilizar el método de captura de híbridos. De igual manera, Shah (1997) compara la técnica de Captura de híbridos contra PCR en cuanto a la detección de ADN de VPH, encontrando que el PCR tuvo una alta sensibilidad (89% contra 48%) pero baja especificidad (43% contra 93%) en la detección de VPH en raspados cervicales. Sin embargo, a pesar de que ambos métodos puedan tener algunas diferencias, su uso puede ser complementario particularmente en el diagnóstico dentro del área clínica.

La prevalencia verdadera de la infección cervical por VPH en población general es desconocida, ciertamente es muy alta, y puede ser tanto como un 60% o más en las mujeres sexualmente activas por abajo de los 35 años de edad. En nuestro estudio se tuvo una prevalencia para VPH del 60.4%, a partir de todas las muestras analizadas, esto último concuerda con lo reportado en otros países (Muñoz *et al.* 1992; Bosch *et al.* 1995).

Ahora bien, la distribución geográfica y en los diferentes estadios de la lesión cervical de los diversos tipos virales es variable en distintas regiones del mundo, según se ha podido comprobar mediante estudios de prevalencia realizados en diferentes países. En nuestro estudio, también encontramos una alta positividad a VPH (95.5%) en las muestras de CaCu invasor (Gráfica 2). Donde el VPH 16 predominó en el 50% de los tumores. Estos resultados, concuerdan con los datos obtenidos del estudio epidemiológico más completo del momento (Bosch *et al.* 1995; Walboomers *et al.* 1999), donde se reporta una prevalencia de VPH en CaCu, del 93%. Posteriormente, estos autores, analizaron nuevamente las muestras que fueron negativas, de este estudio, reportando una positividad del 99.7% (Walboomers, *et al.* 1999), la presencia de VPH en casi todas las muestras de cáncer cervicouterino pone de manifiesto la gran relación que guardan ambas variables, por lo que se considera uno de los factores de riesgo indispensable en el desarrollo de esta enfermedad (Lombard *et al.* 1998).

Mientras que en el grupo de mujeres sanas se encontró un 23.1% de muestras positivas a VPH, lo que es comparable con lo reportado para otras poblaciones (Kiviat *et al.* 1989; Melkert *et al.* 1993; Hildesheim *et al.* 1994; Berumen *et al.* 1997a), lo relevante de

este punto es que algunos autores asumen que en la minoría de mujeres sanas que son positivas a VPH 16 o VPH 18, se puede presentar cáncer cervical después de un largo período de latencia, de acuerdo con esto es importante conocer la relación entre la edad y la prevalencia de VPH en la población general.

En cuanto a las lesiones de alto grado (NIC II-III) la positividad a VPH fue similar a la registrada en el grupo de mujeres con cáncer invasor, de hecho hay trabajos que reportan que 60-90% de los casos estudiados contienen secuencias virales y que resulta necesaria una persistencia de infección con virus de alto riesgo para el desarrollo y mantenimiento del estadio NIC III y su progresión a cáncer invasor (Schiffman *et al.* 1993; Remmink *et al.* 1995; Nobbenhuis *et al.* 1999). Se observa también, que la prevalencia de VPH aumenta conforme evoluciona o progresa la enfermedad (Gráfica 2), esto apoya la participación de este virus en el desarrollo de CaCu (Van den Brule *et al.* 1990; Herrero *et al.* 2000).

Con base en lo anterior, se considera que es importante que se realicen estudios que pongan de manifiesto, cómo se esta dando la asociación entre el virus y la enfermedad. La infección por Papilomavirus es muy frecuente en mujeres jóvenes sexualmente activas. Sin embargo los factores de riesgo precisos para el desarrollo de la infección, su incidencia y duración en cada una de las etapas de la neoplasia cervical no esta bien definida. Algunos trabajos reportan que el pronóstico de las pacientes con cáncer cervical depende del potencial oncogénico del tipo viral con el cual están infectadas (Remmink *et al.* 1995; Ho *et al.* 1998). De esta manera, Lombard *et al.* 1998, reporta que los tumores que tienen VPH 18 asociado presentan un pobre pronóstico, mientras que las lesiones asociadas con virus de riesgo intermedio tienen un curso más favorable.

La utilidad clínica de la prueba de detección de papilomavirus siempre ha sido complicada, debido a que este virus es común después de una infección transitoria en mujeres jóvenes, además de que en pacientes que inicialmente son positivas a VPH y cuya prueba subsiguiente fue negativa, la enfermedad tiende a revertir. Para que clínicamente sea útil, la prueba del VPH debe tener una razón justificada en el tratamiento de la paciente, una de ellas puede ser identificar mujeres en riesgo elevado de sufrir neoplasia cervical y la

otra es para la subclasificación de mujeres con NIC de bajo grado dentro de grupos de riesgo alto y bajo, de progresar a cáncer cervical. De ahí la importancia de detectar el virus en estadios tempranos para establecer un tratamiento inmediato y realizar un seguimiento, con visitas consecutivas para toma de muestra de la paciente (Wright *et al.* 1993; Ikenberg 1994; Cuzick *et al.* 2000).

La distribución de los tipos virales en los diferentes estadios de lesión cervical encontrados en este trabajo fue similar a la observada en otras partes del mundo (Walboomers *et al.* 1999; Herrero *et al.* 2000), donde el VPH 16 fue el que se encontró con mayor frecuencia (46.2%), seguido de VPH 18 (16%) y VPH 31 (3.2%), particularmente en muestras de cáncer invasor y lesiones de alto grado. Otro tipo viral encontrado en varias muestras fue el VPH 51 (9.6%), que se considera como un virus de riesgo intermedio (Cuadro 2). Se encontraron en total 17 tipos de VPH.

Al clasificar los tipos virales encontrados, por riesgo oncogénico (Gráfica 3), los grupos de cáncer invasor y lesiones de alto grado (NIC II-III) registraron mayor positividad a VPH de alto riesgo, en comparación con el grupo de mujeres sanas. Dentro de los virus del papiloma humano de alto riesgo, se sabe que los tipos 16 y 18 son de particular importancia en la génesis de CaCu (Bosch *et al.* 1992; Muñoz *et al.* 1997). El VPH 18, por ejemplo, se ha observado que se asocia generalmente con tumores muy agresivos y menos diferenciados. Sin embargo a pesar de su naturaleza agresiva, en algunas ocasiones VPH 18 se asocia con un fenotipo tumoral diferente, característico de infecciones con tipos virales de bajo riesgo como 6 u 11 (McLachlin *et al.* 1994). A este respecto, resulta importante considerar las evidencias que señalan que variantes de los tipos virales 16 y 18 pudieran tener funciones biológicas diferentes afectando su potencial oncogénico (Lizano *et al.* 1997a; Lizano *et al.* 1997b; Zehbe *et al.* 1999).

Los estudios llevados a cabo por Hecht *et al.* (1995) sugieren que la variabilidad genética de VPH-18 puede ser responsable del amplio espectro de patologías asociadas a este tipo viral. Estos autores identifican una variante de VPH-18 en el 40% de muestras

con neoplasia intraepitelial cervical, mientras que no la observan en los casos de cáncer invasor, sugiriendo que dicha variante tiene un menor potencial oncogénico. De esta manera podríamos pensar que la presencia de VPH-18 en el grupo de mujeres sanas y lesiones de bajo grado (Gráfica 4) podría corresponder a alguna variante de este virus, que se comporta en una forma menos agresiva, otro punto de vista sería que la presencia de este virus podría influir en el desarrollo posterior de una lesión cervical, con esto consideramos que sería de gran importancia el estudio de la prevalencia de estas variantes en la población mexicana para tratar de establecer una posible relación entre su presencia y el riesgo a desarrollar CaCu. El conocimiento de la asociación de estas variantes virales con los tipos histológicos definidos de los tumores aportará datos valiosos en el estudio y búsqueda de un posible tratamiento de la enfermedad. De esta manera, si en verdad las variantes virales presentan comportamientos diferentes (Fu-Xi *et al.* 1997; Zehbe *et al.* 1999), el estudio de su prevalencia podría establecer las bases para la caracterización de grupos o comunidades enteras con alto riesgo para el desarrollo de tumores malignos.

Dentro del interés en encontrar un método de diagnóstico para VPH y cáncer cervical, que resulte confiable, fácil de realizar y en el que la toma de la muestra no sea incómoda, se ha buscado el ADN del virus en diferentes muestras como son biopsia, exudado cervical, plasma, suero, etc. (Bosch *et al.* 1992; Muñoz *et al.* 1993a; Wright *et al.* 1993; Dueñas *et al.* 1999). En cuanto a la positividad a papilomavirus de acuerdo al tipo de muestreo (biopsia y raspado cervical), se encontró que la detección de VPH fue mayor en las muestras obtenidas por biopsia (75%), que la obtenida por raspado cervical (61%) (Cuadro 3), esto probablemente debido a que el muestreo del cérvix realizado con espátula de ayre no es muchas veces lo suficientemente representativo del endocérvix, lugar en donde residen muchas lesiones malignas y en donde pueden encontrarse nichos de infección viral importantes. Por esto, sabemos que el raspado contiene un barrido de todo el cérvix, en el cual quedan las células malignas combinadas con células normales y de otros tipos, en comparación con el muestreo por biopsia en el que se toma una muestra dirigida y concentrada de células malignas.

Por otro lado, el hallazgo de cierto número de casos negativos a VPH en el raspado cervical y positivos en la biopsia, podría ser el resultado de varios factores, como la existencia de menor cantidad de ADN vírico en algunos casos, presencia de inhibidores de la PCR en el moco cervical o muestreo inapropiado, como lo indica Nubia Muñoz (1993b) y Eluf-Neto (1994).

También se observó que la sensibilidad de la detección de VPH mediante el raspado cervical, con la técnica de PCR, resultó ser baja (81%), ya que se escapan casi un 20% de resultados probablemente positivos. En relación a la concordancia observada, la reproducibilidad del resultado entre biopsias y raspado cervical fue satisfactoria ( $Kappa=65.25\%$ ).

Para que la detección de VPH en muestras obtenidas por raspado cervical funcione, es claro que se deben mejorar las técnicas de muestreo, utilizando herramientas más adecuadas que garanticen la toma de material representativo tanto del endocérvix como del exocérvix del cuello del útero. Por ejemplo, en el método de captura híbrida se ha mejorado la toma de la muestra, al utilizar un cepillo especial que permite una toma eficiente de células del endocérvix y exocérvix que se introducen en un buffer que las preserva adecuadamente.

Sin embargo, aunque los resultados con los métodos anteriores sean satisfactorios, en la actualidad la utilidad de dichas pruebas en sus formas comerciales se ve limitado por problemas de sensibilidad y especificidad, además de que resultan demasiado caras para establecerse como técnicas de rutina, por lo que hoy en día la citología cervicovaginal (Papanicolaou) sigue siendo el método de elección, aún con sus posibles deficiencias (Clavel *et al.* 1998; Cuzick *et al.* 2000). A este respecto en un estudio de control de calidad de citologías cervicales en México, los resultados mostraron un alto porcentaje de citologías de baja calidad en una muestra probabilística del programa de detección temprana de cáncer en México, ocasionando por consiguiente, una baja detección de cáncer cervical y esto demuestra la necesidad de implementar programas permanentes eficientes en el registro, recolección de la muestra, fijación y transporte del material citológico al

laboratorio de citodiagnóstico, para asegurar una mayor calidad del muestreo y preservación de la muestra. En México, así como en la mayoría de los países latinoamericanos, los programas de detección oportuna de cáncer presentan algunos problemas en la supervisión de laboratorios de citodiagnóstico, que incluye la deficiencia en el control de calidad en la toma de la muestra, así como, la carencia de personal altamente capacitado (Wright *et al.* 1993; Lazcano-Ponce *et al.* 1994)

En los países con campañas de detección adecuada, usando el Papanicolaou (Pap), se ha observado una importante disminución de la incidencia y mortalidad por CaCu, atribuible a la detección de lesiones precursoras y preinvasoras, displasias o neoplasias intraepiteliales cervicales. En México, el impacto logrado por el programa es bajo, debido, entre otros factores, a una cobertura insuficiente (Meneses-González *et al.* 1999), deficiencia en la toma de la muestra, interpretación inadecuada del estudio citológico y falta de diagnóstico y tratamiento oportuno de las lesiones diagnosticadas. Se reporta que el Pap tiene una alta sensibilidad (75%) y especificidad (95%); sin embargo, la tasa de resultados falsos negativos estimados por la literatura en el mundo varía de 5 a 50% (CENIDS-SSA, 1999).

De acuerdo a lo anteriormente mencionado, la baja eficiencia reportada en cuanto a la detección de VPH y la mala calidad de las citologías, consideramos que este trabajo es muy importante y de gran ayuda en la detección del ADN viral, por utilizar métodos directos y confiables, los cuales pueden ser utilizados a la par con la citología cervicovaginal, de una manera complementaria. La detección específica de VPH, es de suma importancia en el seguimiento de la paciente con infección persistente, para determinar una posible progresión o regresión de la lesión cervical, en caso de presentarla; esto es, si la paciente presenta el tipo viral 16 o 18, tendrá un mayor riesgo de progresar a cáncer invasor y se le tendrá que seguir muy de cerca con evaluaciones consecutivas para determinar el estado de la infección viral (Liaw *et al.* 1999). Además de relacionar el entorno en que se desenvuelven estas mujeres, al estudiar su vida sexual y reproductiva, su nivel socioeconómico, etc., que finalmente todo parece influir en el desarrollo y progresión de la enfermedad (Elfgren *et al.* 2000; Cuzick *et al.* 2000).

Con el conocimiento de los tipos virales más asociados a cáncer cervical, se ha tratado de establecer medidas de prevención primaria y secundaria para esta malignidad, estas medidas consisten en desarrollar algún tipo de vacuna que protejan al huésped de la infección por VPH (vacuna profiláctica) o que induzcan regresión de las lesiones ya establecidas como el cáncer invasor (vacuna terapéutica) (Wheeler, 1997; Berumen *et al.* 1997b; Gariglio *et al.* 1998; Cornelison, 2000). De ahí la importancia de realizar estudios de detección y tamizaje de VPH en población abierta, como un primer paso en el desarrollo de medidas preventivas contra el cáncer cervicouterino (Guzmán-Rojas, 1998).

Por otro lado, el hecho de que muy pocas pacientes con infección persistente por VPH progresen a una lesión cervical de alto grado o cáncer invasor, parece indicar que existen otros factores o cofactores adicionales que incrementan la progresión a la malignidad. Entre ellos, además de los tipos virales y sus variantes, se encuentran factores del propio hospedero como son: genéticos, inmunosupresión, estado hormonal, paridad, edad de inicio de vida sexual activa, entre otras y finalmente los factores exógenos como uso de anticonceptivos, tabaquismo e infecciones vaginales (Bosch *et al.* 1992; Muñoz *et al.* 1993b; Lazcano-Ponce, 1995).

En nuestro estudio se contemplan algunos de estos factores, asociados a la presencia de infección por papilomavirus y cáncer cervical. Información que resulta ser relevante porque identifica mujeres de alto riesgo de presentar CaCu, la cual puede utilizarse en la planificación de programas poblacionales de detección oportuna de cáncer cervical.

Como se observa en la Gráfica 5, se presentan puntos de incidencia de cáncer invasor, y de lesiones de alto grado; uno de ellos en edades muy jóvenes, el segundo en edades mayores (50-59 años) y en el tercero, que corresponde a mujeres en edad avanzada, se nota un descenso en la incidencia. El pico de incidencia de cáncer cervical en mujeres mayores de 40 años puede ser explicado por la larga duración o persistencia de la infección de VPH probablemente de alto riesgo. Una disminución en la prevalencia de VPH en mujeres mayores puede ser debido a que adquirieron inmunidad a la infección por VPH

durante las infecciones transitorias que pudieron haber tenido, lo que también explica el porque no todas las mujeres infectadas desarrollan NIC o cáncer cervical. (Melkert *et al.* 1993; Kuperman *et al.* 2000).

Se ha publicado que el nivel de escolaridad está asociado a neoplasia intraepitelial cervical. Esto es, a menor nivel de escolaridad, mayor riesgo (Frias *et al.* 1999). En cuanto a la escolaridad registrada (Gráfica 6), se encontró que la gran mayoría de las mujeres participantes en el estudio (74.4%), y que presentaron cáncer invasor fueron analfabetas, mientras que en el grupo de mujeres sanas sólo se encontró un 18% de analfabetismo. Estos resultados nos hablan de un diferente grado de cultura en la población analizada, lo que se refleja en el interés de mantener su salud en condiciones optimas. La mujer analfabeta (por sus propias condiciones de vida, pobreza, etc), no tiene acceso a la información sobre medidas de prevención de enfermedades, y sólo acude al médico cuando ya la enfermedad esta muy avanzada. Mientras que en el lado opuesto están aquellas mujeres con más preparación, que tienen los medios necesarios para poder mantener su salud en buenas condiciones, de aquí que se establezca la relación antes señalada.

A este respecto en un estudio de registro de prevalencia de uso de la prueba de Papanicolaou se reporta que la mayor prevalencia de uso alguna vez en su vida se registró en mujeres que habían estudiado cualquier año de la educación básica, siguiéndoles las que tenían algún año del ciclo secundario, mientras que aquellas con menor escolaridad declarada registraron las tasas mayores de prevalencia al no practicarse la prueba (Meneses-González. *et al.*, 1999).

El posible papel del tabaquismo en mujeres, como un cofactor en la génesis de la neoplasia cervical ha sido investigado extensamente (Herrero *et al.* 1989; Bosch *et al.* 1992; Muñoz *et al.* 1993b; Deacon *et al.* 2000). Sin embargo, en este estudio no hubo evidencia de interacción entre VPH y tabaquismo (Gráfica 7), aunque en algunos estudios lo llegan a considerar como otro más de los factores de riesgo para cáncer cervical (Bosch

*et al.* 1992; *Campion et al.* 1995; McDonald, 1999; Ylitalo, 1999; Deacon *et al.* 2000), argumentando que la nicotina y los bioproductos del cigarrillo se concentran en el moco cervical y disminuyen la capacidad inmune de las células de Langerhan's, que protegen al epitelio cervical de factores oncogénicos, como una infección por VPH.

De igual manera la interacción entre el uso de anticonceptivos orales y VPH no fue estadísticamente significativo (Gráfica 9), como lo es en otros países. Sin embargo no podemos asegurar que los anticonceptivos no estén jugando un papel importante en el desarrollo de una lesión cervical, ya que se tendrían que analizar más datos, como el tiempo de uso y comportamiento sexual de la paciente, ya que se ha reportado que el uso de anticonceptivos orales por largos periodos de tiempo puede incrementar hasta cuatro veces el riesgo de cáncer cervical en mujeres portadoras de VPH (Eluf-Neto *et al.* 1994; *Campion et al.* 1995; Deacon *et al.* 2000).

Una de las variables que ha mostrado tener más relación con la presencia de infección por VPH y cáncer cervical es la edad de inicio de vida sexual activa. En algunos estudios se hace énfasis de que esta variable puede ser un factor importante en la infección cervical, debido al contacto a edades tempranas con infecciones bacterianas o virales (*Campion et al.* 1995; *Koutsky et al.* 1997; *Frias et al.* 1999). Nuestros resultados mostraron que para el grupo de mujeres que presentaron cáncer cervical, la edad de inicio de vida sexual fue alrededor de los 17 años, lo que contrasta con el grupo de mujeres sanas, cuya edad promedio de inicio fue a los 20 años. Al comparar la media de edad de ambos grupos se encontró una diferencia significativa (cuadro 4), con lo que se puede decir que el inicio de vida sexual en edades tempranas constituye uno de los principales factores de riesgo para cáncer cervical. Estudios llevados a cabo en diferentes poblaciones muestran resultados similares a los nuestros, en términos de inicio de vida sexual (*Campion, 1995; Lazcano-Ponce et al.* 1995; *Hernández et al.* 1997; Deacon *et al.* 2000).

sexuales de su pareja y como está influyendo en la presencia de infección cervical por VPH (Karlsson *et al.* 1995; Burk *et al.* 1996; Marrazzo *et al.* 2000). Por consiguiente la conducta sexual es un factor importante para adquirir infección por VPH particularmente en mujeres jóvenes, pero resulta más difícil demostrar esta relación con enfermedad persistente en mujeres de mayor edad.

La paridad en diferentes trabajos ha mostrado ser factor asociado a CaCu en lesiones avanzadas y tempranas. La alta paridad y la edad del primer embarazo, están asociadas con un elevado riesgo de NIC III. El primer embarazo es un punto importante, ya que los cambios hormonales ocurridos durante el embarazo puede facilitar la infección por VPH, al presentar algún efecto inmunosupresor. Además de que el impacto hormonal causa hipertrofia del cuello uterino, entonces el epitelio columnar del endocervix se evierte hacia el exocervix, exponiéndolo nuevamente al medio ácido de la vagina e iniciando así una metaplasia escamosa (Eluf-Neto *et al.* 1994; Campion *et al.* 1995; Karlsson *et al.* 1995; Koutsky, 1997).

Los resultados de este trabajo concuerdan con lo mencionado anteriormente, ya que se encontró una fuerte asociación entre la presencia de cáncer cervical y el registro de tres o más embarazos en las mujeres estudiadas (Gráfica 13). Ahora bien, aunado a esta variable, también se encontró que el número de partos fue factor de riesgo para cáncer cervical, asociado además con la presencia de VPH (Gráfica 16), pero el riesgo no se incrementó conforme aumento el número de partos (Gráfica 15).

Finalmente, también se valoró el número de abortos (Gráfica 14), sin encontrar ninguna relación con el desarrollo de neoplasia cervical e infección por VPH. Un dato interesante resultó al analizar esta variable agrupados por tipo de lesión, en donde se pudo corroborar que la presencia de lesión cervical esta en relación directa con la presencia de VPH ( $P=0.001$ ), por lo que se puede decir que la presencia de abortos en la historia reproductiva de las mujeres no incrementa el riesgo de infección por VPH ni de lesión cervical. Estos datos están de acuerdo con lo reportado en otras poblaciones y sobretodo en un trabajo realizado en población mexicana (Parazzini *et al.* 1989; Lazcano-Ponce *et al.* 1995; Frías *et al.* 1999).

## CONCLUSIONES

El aumento de la incidencia de cáncer cervical en mujeres jóvenes sugiere la presencia de nuevos factores de alto riesgo que afectan a las nuevas generaciones, que cambian en severidad y en el tiempo en diferentes países. Si bien conocemos detalles moleculares de la interacción de productos celulares y virales, la historia natural de las infecciones por papilomavirus es menos clara, pues a pesar de la presencia de virus de alto riesgo oncogénico, algunas lesiones revierten o permanecen inalterables durante toda la vida. Se ha propuesto entonces que el VPH es una condición necesaria pero no suficiente para el desarrollo de un cáncer invasor y que se requieren otros eventos celulares que cooperen para su desarrollo.

Por lo tanto, las conclusiones que se derivan de este trabajo son las siguientes:

- \* La positividad para VPH es alta en neoplasia cervical de alto grado (NIC II-III) y cáncer invasor, y disminuye en las lesiones de bajo grado (NIC I) y mujeres sanas.
- \* El VPH 16 se encontró con mayor frecuencia en las lesiones de alto grado y cáncer invasor, seguido de VPH 18 y VPH 51.
- \* La distribución y porcentaje de VPH de alto riesgo fue mayor en las muestras de cáncer invasor en comparación con el grupo de mujeres sanas.
- \* La frecuencia y distribución de VPH en la población mexicana es parecida a lo reportado mundialmente.
- \* El método de PCR para la detección de VPH resulta mucho más sensible con la combinación de diferentes juegos de oligonucleótidos universales, ya que la utilización de un sólo juego de oligonucleótidos nos da una estimación baja de la presencia de VPH en muestras cervicales.

\* La detección de VPH es más eficaz en las muestras obtenidas por biopsia en comparación con las muestras obtenidas por raspado cervical, sin embargo el nivel de concordancia de resultados en ambos tipos de muestreo, fue satisfactorio por lo que no se descarta el utilizar el raspado cervical en la detección del virus, siempre y cuando se mejore la toma de la muestra, que incluya material tanto del endocérvix como del exocérvix.

\* La estrategia a seguir para lograr una buena estimación de la prevalencia, cuando se realizan estudios de detección de ADN de VPH en muestras cervicales es: Una preselección de las muestras con oligonucleótidos universales MY09/MY11. Una amplificación adicional con oligonucleótidos universales L1C1/L1C2 y GP5/GP6 en aquellas que fueron negativas. Y finalmente la tipificación viral, ya sea con oligonucleótidos específicos, o secuenciación directa de los productos de PCR.

\* La probabilidad de presentar cáncer cervical en una mujer aumenta con la ausencia de escolaridad, el elevado número de parejas sexuales y la edad temprana de inicio de vida sexual activa, o al tener el primer hijo. Esto es compatible con la idea de que las infecciones por VPH durante la adolescencia tienen una probabilidad más alta de convertirse en infecciones crónicas que conllevan un mayor riesgo de cáncer cervicouterino. Este riesgo se reduce con cada año que se postergue el comienzo de las relaciones sexuales y la actividad reproductiva hasta alrededor de los 24 años de edad aproximadamente, edad en la cual la demora de la primera relación o el nacimiento del primer hijo no modifica demasiado ese riesgo.

Finalmente, es importante señalar que se requiere y seguirá requiriendo de múltiples investigaciones encaminadas a discernir con mayor precisión la participación del virus del papiloma humano en la historia natural del cáncer cervicouterino, para poder comprender este complejo proceso de progresión de las lesiones premalignas a cáncer invasor, por la acción del virus u otros factores involucrados.

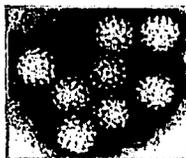
## **Perspectivas:**

Las prioridades en investigación en el área que nos ocupa, y particularmente en la población mexicana, podrían ser:

- Definir un método diagnóstico el cual pueda ser sensible y específico, no invasivo y apropiado para el análisis a gran escala en la identificación de tipos de VPH presentes o para poder predecir cuales lesiones tienen mayor probabilidad de progresar a la malignidad, y así poder establecer programas de detección y tamizaje para VPH y cáncer cervicouterino que sean efectivos, que tengan amplia cobertura en la población general.
- Establecer el riesgo asociado con genotipos específicos de VPH y sus variantes, para la progresión a cáncer genital
- Desarrollar métodos efectivos de tratamiento en la infección por VPH.
- Desarrollar terapias inmunológicas, como posibles vacunas para VPH.

Con todo esto, se lograría una detección temprana del VPH y con el tratamiento adecuado, se podría minimizar el efecto de este virus sobre el cérvix

V P H



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## REFERENCIAS

- Baken L, Koutsky L, Kuypers J, *et al.* Genital human papillomavirus infection among male and female sex partners: prevalence and type-specific concordance. *J Infect Dis*, 1995; 171: 429-432
- Barron B and Richart R, A statistical model of the natural history of cervical carcinoma based on a prospective study of 557 cases. *J Natl Cancer Inst*, 1968; 41: 1343-1353
- Bauer HM, Ting Y, Greer CE, *et al.* Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA*, 1991; 265: 472-477
- Berumen J, Casas L, Segura E, *et al.* Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int J Cancer*, 1994; 56: 640-645
- Berumen J, Miranda E, Zafra G, *et al.* Epidemiología molecular de cánceres de alta incidencia en México. *Gac Méd Méx*, 1997a; 133: 35-41
- Berumen J, Villegas N, Vacunas terapéuticas recombinantes contra el cáncer del cuello uterino. *Salud Pública Méx*, 1997b; 39: 288-297
- Beutner K, Tyring S, Human papillomavirus and disease. *Am J Med*, 1997; 102: 9-15
- Bishop J, Cellular oncogenes and retroviruses. *Ann Rev Biochem*, 1983; 52: 301-354
- Bishop J, Viral Oncogenes. *Cell*, 1985; 42: 23-38
- Boshart M, Gissman L, Ikenberg H, *et al.* A new type of papillomavirus DNA and its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J*, 1984; 3: 1151-1157
- Bosch X, Muñoz N, De Sanjosé S, *et al.* Risk factors for cervical cancer in Colombia and Spain. *Int J Cancer*, 1992; 52: 750-758
- Bosch X, Manos M, Muñoz N, *et al.* Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*, 1995; 87: 796-802
- Boyer S, Wazer D and Band V, E7 Protein of human papilloma virus-16 induces degradation of ratinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Research*, 1996; 56: 4620-4624
- Brinton LA and Hoover RN, Epidemiology of gynecologic cancer *in* Principles and Practice of Gynecologic Oncologic (Hoskins WJ, Perez CA, Young RC) Philadelphia. Lippincott. 1992, pag: 3-26
- Burk R, Ho G, Beardsley L, *et al.* Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J Infect Dis*, 1996; 174: 679-689

Burk R., 1996, [www.aecom.yu.edu/ssgd/faculty/burk.htm](http://www.aecom.yu.edu/ssgd/faculty/burk.htm)

Campion MJ, Ferris DG, Guijón FB, *et al.* Colposcopia Moderna: Un enfoque práctico, 1995; Cap. 2, 3, 4. 250pp.

Cannistra S, Niloff J, Cancer of the uterine cervix. *New Engl J Med*, 1996; 334: 1030-1038

CENIDS-SSA, *Práctica Médica Efectiva*, Cáncer Cervico Uterino. 1999; vol. 1 no.3

Chi-Keong O, Shih-Yen Ch, *et al.* Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol*, 1993; 63: 6424-6431

Clavel C, Bory J, Rihet S, *et al.* Comparative analysis of human papillomavirus detection by hybrid capture assay and routine cytologic screening to detect high-grade cervical lesions. *Int J Cancer*, 1998; 75: 525-528

Cole S, Danos O, Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. *J Mol Biol*, 1987; 193: 599-608

Cope J, Hildesheim A, Schiffman M, *et al.* Comparison of the hybrid capture tube test and PCR for detection of human papillomavirus DNA in cervical specimens. *J Clin Microbiol*, 1997; 35: 2262-2265

Cornelison Terri, Human papillomavirus genotype 16 vaccines for cervical cancer prophylaxis and treatment. *Curr Opin Oncol*, 2000; 12: 466-473

Cramer D, Epidemiologic aspects of gynecologic oncology *in* Knapp Robert and Berkowitz Ross. *Gynecologic Oncology*, 2a ed., 1993, Cap. 8, pag:139-150 McGraw-Hill, Inc.

Crum Ch, and Taylor P, Intraepithelial Squamous Lesions of the cervix *in* Knapp Robert and Berkowitz Ross. *Gynecologic Oncology*, 2a ed., 1993, Cap. 10, pag: 179-191, McGraw-Hill, Inc.

Cuzick J, Terry G, Ho L, *et al.* Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer*, 1994; 69: 167-171

Cuzick J, Sasieni P, Davies P, *et al.* A systematic review of the role of human Papillomavirus (HPV) testing within a cervical screening programme: summary and conclusions. *Br J Cancer*, 2000; 83: 561-565

Deacon JM, Evans CD, Yule R, *et al.* Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN 3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort. *Br J Cancer*, 2000; 88: 1565-1572

DiSaia P, and Creasman WT, *Clinical Gynecologic Oncology*. 15<sup>a</sup> ed., 1997; Cap. 1- 5. Pag: 1-32

- Dueñas A, Carrillo A, Fresnedo L, *et al.* ADN del virus del papiloma humano en el plasma de pacientes con carcinoma cervicouterino: Un potencial marcador de enfermedad residual mínima. *Rev Inst Nal Cancerol (Méx)*, 1999; 45: 203-208
- Dürst M, Glitz D, Schneider A, *et al.* Human papillomavirus type 16 (HPV16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: Analysis by *in situ* hybridization. *Virology*, 1992; 189: 132-140
- Elfgrén K, Kalantari M, Moberger B, *et al.* A population-based five-year follow-up study of cervical human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol*, 2000; 183: 561-567
- Eluf-Neto J, Booth M, Muñoz N, *et al.* Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Br J Cancer*, 1994; 69: 114-119
- Fidler I. Molecular Biology of Cancer: Invasion and Metastasis. In De vita *et al.* Cancer Principles and Practice of Oncology, 1997, chapter 9, pag: 185-198, 5<sup>o</sup> ed. LIPPINCOTT-Raven.
- Frías M, Mohar A, Suchil L, *et al.* Factores de riesgo asociados a cáncer cervicouterino. Un estudio de casos y controles. *Rev Inst Nal Cancerol (Méx)*, 1999; 45: 209-216
- Fu Xi L, Koutsky L, Galloway D, *et al.* Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*, 1997; 89: 796-802
- García-Carranca A, Gariglio P, Aspectos moleculares de los papilomavirus humanos y su relación con el cáncer cérvico-uterino. *Rev Inv Clin*, 1993; 45: 85-92
- Gariglio P, Benitez-Briebesca L, Berumen J, *et al.* Therapeutic uterine-cervix cancer vaccines in humans. *Arch Med Res*, 1998; 29: 279-284
- Gariglio P, López-Bayghen E, Alvarez-Salas L, Virus y cáncer humano: Genética molecular del cáncer cervicouterino. *Rev Inst Nal Cancerol (Méx)*, 1999; 45: 170-176
- Guerrero E, Daniel R, Bosch X, *et al.* Comparison of Virapap, southern hybridization and polymerase chain reaction methods for human papillomavirus identification in a epidemiological investigation of cervical cancer. *J Clin Microbiol*, 1992; 30: 2951-2959
- González-Garay M, Barrera-Saldaña H, Avilés L, *et al.* Prevalence in two mexican cities of human papillomavirus DNA sequences in cervical cancer. *Rev Inv Clin*, 1992; 44: 491-499
- Guzmán-Rojas L, Alcocer-González J, Madrid-Marina V, Perspectivas para el desarrollo de vacunas e inmunoterapia contra cáncer cervicouterino. *Salud Pública de México*, 1998; 40: 38-46
- Hall JE, Etiology of Cancer: Physical factors. In De vita *et al.* Cancer Principles and Practice of Oncology, 1997, chapter 10, pag: 203-215, 5<sup>a</sup> ed. LIPPINCOTT-Raven.
- Hansfield H, Clinical presentation and natural course of anogenital warts. *Am J Med*, 1997; 102: 16-20

- Ham J, Dostatni N, Gauthier J, *et al.* The papillomavirus E2 protein: A factor with many talents. *TIBS*, 1991; 16: 440-444
- Hecht J, Kadish A, Jiang G, *et al.* Genetic Characterization of the human papillomavirus (HPV) 18 E2 gene in clinical specimens suggests the presence of a subtype with decreased oncogenic potential. *Int J Cancer*, 1995; 60: 369-376
- Hernández-Avila M, Lazcano-Ponce E, Berumen J, *et al.* Human papillomavirus 16-18 infection and cervical cancer in México: A case-control study. *Arch Med Res*, 1997; 28: 265-271
- Herrero R, Brinton LA, Reeves WC, *et al.* Invasive cervical cancer and smoking in Latin America. *J Natl Cancer Inst*, 1989; 81: 205-211
- Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, *et al.* Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst*, 2000; 92: 464-474
- Hildesheim A, Schiffman M, Gravitt P, *et al.* Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis*, 1994; 169: 235-240
- Ho G, Bierman R, Beardsley L, *et al.* Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*, 1998; 338: 423-428
- Howley Peter., Papillomaviridae: The viruses and their Replication *in* Fields Virology, third edition, 1996; cap.65 pag.:2045-2076, Lippincott-Raven publishers, Philadelphia.
- Husnjak K, Grce M, Magdic L, *et al.* Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Meth*, 2000; 88: 125-134
- Ikenberg H, Sauerbrei W, Schottmüller U, *et al.* Human papillomavirus DNA in cervical carcinoma correlation with clinical data and influence on prognosis. *Int J Cancer*, 1994; 59: 322-326
- Josefsson A, Magnusson P, Ylitalo N, *et al.* Viral load of human papillomavirus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma *in situ*: a nested case-control study. *The Lancet*, 2000; 355: 2189-2193
- Kastan MB, Molecular Biology of Cancer *in* De vita *et al.* Cancer Principles and Practice of Oncology, 1997, chapter 6, pag: 121-129, 5<sup>o</sup> ed. LIPPINCOTT-Raven.
- Karlsson R, Jonsson M, Edlund K, *et al.* Lifetime number of partners as the only independent risk factor for human papillomavirus infection: A population-based study. *Sex Trans Dis*, 1995; 22: 119-127
- Kelsey J, Thompson D and Evans A, Methods in Observational Epidemiology, 1986, Cap:11, Pag:285-308, OXFORD UNIVERSITY PRESS

Kiviat N, Koutsky L, Paavonen J, *et al.* Prevalence of genital papillomavirus infection among women attending a college student health clinic or a sexually transmitted disease clinic. *J Infect Dis*, 1989; 159: 293-302

Kiviat N and Koutsky L, Specific human papillomavirus types as the causal agents of most cervical intraepithelial neoplasia: Implications for current views and treatment. *J Natl Cancer Inst*, 1993; 85: 934-935

Koss Leopold, The New Bethesda system for reporting results of smears of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst*, 1990; 82: 988-991

Koutsky Laura. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med*, 1997; 102: 3-8

Kuperman L and Krumholz B, The triage of women with ASCUS cytology using human papillomavirus DNA testing. *J Low Genit Tract Dis*; 2000; 4: 1-6

Lasko D, Cavenee W, Nordenskjöld M, Loss of constitutional heterozygosity in human cancer. *Annu Rev Genet*, 1991; 25: 281-314

Lazcano-Ponce E, Alonso de Ruiz P, López-Carrillo L, *et al.* Quality control study on negative gynecological cytology in México. *Diagnostic Cytopathology*, 1994; 10: 10-14

Lazcano-Ponce E, Hernández-Avila M, López-Carrillo L, *et al.* Factores de riesgo reproductivo e historia de vida sexual asociados a cáncer cervical en México. *Rev Inv Clin*, 1995; 47: 377-385

Lazo PA, The Molecular genetics of cervical carcinoma. *Br. J Cancer*, 1999; 80: 2008-2018

Lewin Benjamin. Genes VI., 1998; Cap. 36 y 37 pag: 1089-1167, Oxford University Press.

Liaw K, Glass A, Manos M, *et al.* Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst*, 1999; 91: 954-960

Lizano M, Berumen J, Guido M, *et al.* Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1997a; 89: 1227-1231

Lizano M, García-Carranca A, Las Variantes moleculares de papiloma virus humanos tipo 16, 18 y 45 en tumores del cuello uterino, en México. *Gac Méd Méx*, 1997b; 133: 43-48

Lizano M, García-Carranca A, Aspectos moleculares de los virus del papiloma humano y su participación en el desarrollo del cáncer cervicouterino. *Ann Oncol*, 1998; 7: s233-s244

Lombard I, Vincent-Salomon A, Validire P, *et al.* Human papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer. *J Clin Oncol*, 1998, 16: 2613-2619

Manos M, Ting Y, Wright D, *et al.* Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*, 1989; 7: 209-214

Mansur C and Androphy E. Cellular transformation by papillomavirus oncoproteins. *Bioch Biophys Acta*, 1993; 1155: 323-345

Marrazzo J, Stine K, Koutsky L. Genital human papillomavirus infection in women who have sex with women: A review. *Am J Obstet Gynecol*, 2000; 183: 770-774

McDonald C. Cancer statistics: Challenges in minority populations. *CA-Cancer J Clin*, 1999; 49: 6-7

McLachlin C, Tate J, Zitz J, *et al.* Human papillomavirus type 18 and intraepithelial lesions of the cervix. *Am J Pathol*, 1994; 144: 141-147

McLachlin C, Alanen K, Elit L, *et al.* Hybrid capture human papillomavirus testing as an adjunct to the follow-up of patients with ASCUS and LGSIL pap smears: A study of a screening population. *J Low Genit Tract Dis*, 2000; 4: 12-17

Melkert P, Hopman E, Van den Brule A, *et al.* Prevalence of HPV in cyto-morphologically normal cervical smears, as determined by the polymerase chain reaction, is age-dependent. *Int J Cancer*, 1993; 53: 919-923

Mendoza-Alcantar L, Lara-Ortiz M, Reynoso-Pablos R, *et al.* Detección del papilomavirus humano en ADN de tejido normal y lesiones premalignas del cérvix por hibridación molecular. *Rev Inst Nal Cancerol (Méx)*, 1994; 40: 8-13

Meneses-García A, Chanona-Vilchis J, Sotelo-Regil R. Neoplasias Malignas del cérvix uterino. *Ann Oncol*, 1998; 7: s245-s256

Meneses-González F, Lazcano-Ponce E, Lino-González M, *et al.* Prevalencia del uso de la prueba de Papanicolaou en mujeres de 15 a 49 años en México. *Rev Inst Nal Cancerol (Méx)*, 1999; 45: 17-23

Meyers C, Mayer T, Ozbun M. Synthesis of infectious human papillomavirus type 18 in differentiating epithelium transfected with viral DNA. *J Virol*, 1997; 71: 7381-7386

Mohar A., Frías M, Suchil L, *et al.* Epidemiología descriptiva de cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología de México. *Salud Pública Méx*, 1997; 39: 253-258

Mohar A, Frías M, *et al.* Epidemiología del cáncer cervicouterino en México. *Ann Oncol*, 1998; 7: s222-s226

Mohar A and Frías M. Epidemiology of cervical cancer. *Cancer Invest*, 2000; 18: 584-590

Morrison Ellen. Natural history of cervical infection with human papillomaviruses. *Clin Infec Dis*, 1994; 18: 172-180

Muñoz N, Bosch X, de Sanjosé S., *et al.* The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: A population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer*, 1992; 52: 743-749

Muñoz N, Bosch X, de Sanjosé S, *et al.* Risk factor for cervical intraepithelial neoplasia grade III/ carcinoma *in situ* in Spain and Colombia. *Cancer Epidemiology Biomarker Prevention*, 1993a; 2: 423-431

Muñoz N, Bosch X, de Sanjosé S, *et al.* El Virus del Papiloma Humano en la etiología del cáncer cervicouterino. *Bol of Sanit Panam*, 1993b; 115: 301-308

Muñoz N, Bosch X, de Sanjosé S and Shah K, The Role of HPV in the etiology of cervical cancer. *Mutation Research*, 1994; 305: 293-301

Muñoz N and Bosch X, Cervical cancer and human papillomavirus: Epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud Pública Méx*, 1997; 39: 274-282

Murnane P and Wong-staal F, Etiology of cancer: Viruses *in* De vita *et al.* *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 1997, chapter 8, pag: 153-184, 5<sup>a</sup> ed: LIPPINCOTT-Raven.

Nelson H, Averette E, Richart M, *et al.* Dysplasia, carcinoma *in situ*, and early invasive cervical carcinoma. *CA-Cancer J Clin*, 1984; 34: 306-327

Nobbenhuis M, Walboomers J, Helmerhorst T, *et al.* Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: A prospective study. *The Lancet*, 1999; 354: 20-25

Ordoñez R, Mendoza L, Reynoso R, *et al.* Papilomavirus humano en pacientes con cáncer cervicouterino en el Instituto Nacional de Cancerología. *Rev Inst Nal Cancerol (Méx)*, 1993; 39: 1809-1813

Parazzini F, La Vecchia C, Negri E, *et al.* Reproductive factors and the risk of invasive and intraepithelial cervical neoplasia. *Br J Cancer*, 1989; 59: 805-809

Parkin DM, Läärä E, and Muir CS, Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int J Cancer*, 1988; 41: 184-197

Perkins A and Stern D, Molecular Biology of Cancer: Oncogenes *in* De vita *et al.* *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 1997, chapter 4, pag: 79-102, 5<sup>a</sup> ed. LIPPINCOTT-Raven.

Peyton C, Schiffman M, Lörincz A, *et al.* Comparison of PCR and Hybrid Capture-based human papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. *J Clin Microbiol*, 1998; 36: 3248-3254

Platz CE and Benda JA, Female Genital Tract. *Cancer*, 1995; 75: 270-294

Qu W, Jiang G, Cruz Y., *et al.* PCR Detection of human papillomavirus: Comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol*, 1997; 35: 1304-1310

- Reeves WC, Brinton LA, Brenes M, *et al.* Case-control study of cervical cancer in Herrera province, Republic of Panama. *Int J Cancer*, 1985; 36: 55-60
- Reeves WC, Brinton LA, García M, *et al.* Human papillomavirus infection and cervical cancer in Latin America. *N Engl J Med*, 1989; 320: 1437-1441
- RHNM (Registro Histopatológico de Neoplasias en México), 1997, Secretaria de Salud. 103pp
- Remmink A, Walboomers J, Helmerhorst T, *et al.* The Presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: Natural history up to 36 months. *Int J Cancer*, 1995; 61: 306-311
- Resnick R, Cornelissen M, Wright D, *et al.* Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst*, 1990; 82: 1477-1484
- Rhoda Alani and Karl Münger. Human papillomaviruses and associated malignancies. *J Clin Oncol*, 1998; 16: 330-337
- Richart R, Natural History of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Obstet Gynecol*, 1968; 10: 748-784
- Richart R and Wright T, Controversies in the management of low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer*, 1993; 71: 1413-1421
- Roden R, Kirnbauer R, Jenson B, *et al.* Interaction of Papillomavirus with the cell surface. *J Virol*, 1994; 68: 7260-7266
- Sambrook J, Fritsch E and Maniatis T, Molecular cloning: A laboratory manual. 1989, Tomo 2, pag: 9.16, Cold Spring Harbor, Laboratory Press. USA.
- Sanger F, Nicklen S and Coulson A, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*, 1977; 74: 5463-5467
- Sarkar F and Crissman J, Detection of human papillomavirus DNA sequences by Polymerase Chain Reaction. *BioTechniques*, 1990; 9: 180-185
- Schiffman M, Validation of HPV hybridization assays: Correlation of filter *in situ*, Dot blot and PCR with Southern blot *in* The Epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus. 1992, Publication no. 119, pag. 169-179, International Agency for Research on Cancer: Lyon.
- Schiffman M, Bauer H, Hoover R, *et al.* Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*, 1993; 85: 958-964
- Schlesinger M, Yodfat Y, Rabinowitz R, *et al.* Psychosocial stress and NK cells among members of a communal settlement. *Adv Exp Med Biol*, 1993; 335:247-254

Schneider A and Kousky L, Natural history and epidemiological features of genital HPV infection *in* Muñoz N, Bosch X, Shah K and Meheus A (eds), The epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus, IARC Scientific Publications, 1992; no.119, pp.23-52

Schwarz E, Freese U, Gissmann L, *et al.* Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*, 1985; 314: 111-114

Snijders P, Van den Brule A, Schrijnemaker H, *et al.* The Use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol*, 1990; 71: 173-181

Seedorf K, Krämmer G, Dürst M, *et al.* Human Papillomavirus type 16 Sequence. *Virology*, 1985; 145: 181-185

Shah K, Solomon L, Daniel R, *et al.* Comparison of PCR and Hybrid capture methods for detection of human papillomavirus in injection drug-using women at high risk of human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol*, 1997; 35: 517-519

Stern Peter, Immunity to human papillomavirus-associated cervical neoplasia. *Adv Cancer Res*, 1996; 69: 175-211

Tamayo-Legorreta E, Echaniz G, Cruz A, *et al.* Infección por virus del papiloma humano en mujeres con y sin citología cervical anormal. *Ginec Obstet Méx*, 1993; 61: 27-34

Ting Yi and Manos Michele, Detection and typing of genital human papillomaviruses *in* PCR protocols: A guide to methods and applications. 1990, pag: 356-367

Torroella M and Villa S, Bases Genéticas del Cáncer. 1998a Fondo de Cultura Económica, 133pp.

Torroella M, Morsberger S, Carrillo A, *et al.* HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecol Oncol*, 1998b; 70: 115-120

Trichopoulos D, Lipworth L, Petridou E, *et al.* Epidemiology of Cancer, *in* De vita *et al.* Cancer Principles and Practice of Oncology, 1997, chapter 12, pag: 231-249, 5<sup>a</sup> ed. LIPPINCOTT-Raven.

Trofatter K, Diagnosis of human papillomavirus genital tract infection. *Am J Med*, 1997; 102: 21-27

Van den Brule A, Meijer C, Bakels V, *et al.* Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer mediated and type specific polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1990; 28: 2739-2743

Van den Brule A, Snijders P, Raaphorst P, *et al.* General primer polymerase chain reaction in combination with sequence analysis for identification of potentially novel human papillomavirus genotypes in cervical lesions. *J Clin Microbiol*, 1992; 30: 1716-1721

- Van Nagell J, Higgins R and Powell D, Invasive Cervical Cancer in Knapp Robert and Berkowitz Ross. Gynecologic Oncology, 2a ed., 1993, Cap. 11, pag: 192-222, Mcgraw-Hill, Inc.
- Van Ranst M, Tachezy R, Delius H, *et al.* Taxonomy of the Human Papillomaviruses. *Papillomavirus Report*, 1993; 4: 61-65
- Varmus H, The Molecular genetics of cellular oncogenes. *Ann Rev Genet*, 1984; 18: 553-612
- Villa Luisa, Human Papillomaviruses and Cervical Cancer. *Adv Cancer Res*, 1997; 71: 321-341
- Walboomers J, Jacobs M, Manos M, *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 1999; 189: 12-19
- Weinberg RA, Tumor Suppressor Genes. *Science*, 1991; 254: 1138-1146
- Werness B, Levine A, Howley P, Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, 1990; 248: 76-79
- Werness Bruce, Cáncer cervicouterino: En busca de una etiología infecciosa. *Contemporary Oncology*, 1995; julio-agosto, pag: 13-21
- Wheeler Cosette, Preventive vaccines for cervical cancer. *Salud Pública Méx*, 1997; 39: 283-287.
- Wright T and Ferenozy Alex, Pruebas Virales para VPH: ¿Qué nos informan? The Female Patient, 1993; 18: 69-74 una publicación de *Excerpta Médica*.
- Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, *et al.* Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cancer Res*, 1991; 82; 524-531
- Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson A, *et al.* Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma *in situ*: A nested case-control study. *The Lancet*, 2000; 355: 2194-2198
- Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson A, *et al.* Smoking and oral contraceptives as risk factors for cervical carcinoma *in situ*. *Int J Cancer*, 1999; 81: 357-365
- Yuspa S and Shields G, Etiology of Cancer: Chemical factors, in De vita *et al.* Cancer Principles and Practice of Oncology, 1997, chapter 9, pag: 185-198, 5ª ed. LIPPINCOTT-Raven.
- Zamora PA y Terrés SA, Infección por virus del papiloma humano en mujeres y hombres mexicanos identificación por el sistema de captura de híbridos. *Rev Mex Patol Clín*, 1998; 45: 9-16
- Zar Jerrold, Biostatistical Analysis, 1984, Cap: 5, 10 and 22, second edition, PRENTICE-HALL. INC.

Zehbe I and Tommasino M, The biological significance of human papillomavirus type 16 variants for the development of cervical neoplasia. *Papillomavirus Report*, 1999; 10: 105-116

Zur Hausen H, Human Papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1977; 78: 1-30

Zur Hausen H, Papillomavirus Infections-a major cause of human cancers. *Bioch Biophy Acta*, 1996; 1288: F55-F78

Zur Hausen H, Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*, 2000; 92: 690-698





**APENDICE**

Folio:

Expediente:

**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA  
SUBDIRECCION DE INVESTIGACION BASICA  
SUBDIRECCION DE INVESTIGACION CLINICA  
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA**

**Título del proyecto:**

**“INFECCION POR VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN MUJERES MEXICANAS SANAS,  
CON LESION PREMALIGNA Y MALIGNA DEL CERVIX”**

**Investigadores:**

Dra. Martha Torroella K., Biol. Adela Carrillo G., M. en C. Mauricio Frías M., Dr. Gilberto Solorza L., Dr. Abelardo Meneses G., Dra. Marcela Lizano S., Dr. Alejandro Mohar B.

**Procedimiento:**

El propósito del estudio es determinar los factores asociados a cáncer cervicouterino e infección con papilomavirus humano. El método de estudio consiste en una entrevista directa, y en proporcionar una muestra de células del cervix (Pap), así como, una pequeña biopsia, de ser necesaria para el diagnóstico. Los resultados del análisis de las muestras me serán entregados y son estrictamente confidenciales. Ninguna información que me identifique será usada en cualquier reporte o publicación sobre este estudio.

**Riesgo:**

Entiendo que la muestra de células del cervix (Pap), así como, la biopsia que donaré me causaran pequeñas molestias y que existe poca probabilidad de que esto me provoque un daño mayor.

**Alternativas de la participación:**

He sido completamente informada, de la naturaleza y propósitos del estudio, además de los riesgos por participar en el. Todas mis dudas han sido aclaradas, por lo tanto, estoy de acuerdo en participar en el estudio, en el entendido de que puedo renunciar a participar en el mismo, aún después de haber firmado esta carta de consentimiento, y sin ninguna justificación. Esto no implica que mi tratamiento o mis cuidados médicos se vean afectados por mi decisión. Si en cualquier momento siento que mis dudas no han sido contestadas adecuadamente, puedo ponerme en contacto con el Comité de Investigación del Instituto.

\_\_\_\_\_  
Nombre del Investigador

\_\_\_\_\_  
Nombre de la encuestada

\_\_\_\_\_  
Nombre del testigo

\_\_\_\_\_  
Firma del investigador

\_\_\_\_\_  
Firma de la encuestada

\_\_\_\_\_  
Firma del testigo

Folio:  
Expediente:


NOMBRE DEL ENCUESTADOR (A): \_\_\_\_\_

FECHA DE LA ENTREVISTA: \_\_\_\_\_

HORA DE INICIO DE LA ENTREVISTA: \_\_\_\_\_

HOSPITAL O CLINICA DE PROCEDENCIA: \_\_\_\_\_

**DATOS DEMOGRAFICOS DE LA ENCUESTADA**

1.- Nombre \_\_\_\_\_

2.- Domicilio \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

3.- Edad \_\_\_\_\_

4.- Fecha de nacimiento \_\_\_\_\_

5.- Cuál es su ocupación: \_\_\_\_\_

6.- Cuál es su escolaridad: \_\_\_\_\_

7.- Cuál es su estado civil: \_\_\_\_\_

**DATOS DE HISTORIA REPRODUCTIVA Y VIDA SEXUAL**

8.- A qué edad fue su primera menstruación: \_\_\_\_\_

9.- Fecha de última menstruación: \_\_\_\_\_

10.- Cuántos embarazos ha tenido: \_\_\_\_\_

11.- Cuántos embarazos fueron partos: \_\_\_\_\_

12.- Cuántos embarazos fueron cesárea: \_\_\_\_\_

13.- Cuántos abortos ha tenido: \_\_\_\_\_

14.- Cuántos abortos fueron inducidos: \_\_\_\_\_

15.- A qué edad tuvo a su primer hijo: \_\_\_\_\_

16.- A qué edad tuvo al último hijo: \_\_\_\_\_

17.- A utilizado algún método para no embarazarse: \_\_\_\_\_

18.- Qué método y por cuánto tiempo:	tiempo de uso:
anticonceptivos orales	_____
anticonceptivos inyectables	_____
barrera (condón, diafragma)	_____
DIU	_____
espermaticidas (óvulos, espumas)	_____

19.- A qué edad tuvo su primera relación sexual: \_\_\_\_\_

20.- Cuántas parejas sexuales ha tenido: \_\_\_\_\_

21.- Con cuántas de sus parejas ha durado por más de seis meses: \_\_\_\_\_

### DATOS DE HISTORIA CLINICA

22.- Alguna vez se ha realizado la prueba del cáncer (Papanicolaou): \_\_\_\_\_

23.- Cada cuándo se hace la prueba de Papanicolaou: \_\_\_\_\_

24.- Ha padecido alguna enfermedad venérea o infecciosa: \_\_\_\_\_

25.- Describa cuál ha sido:

Sífilis	_____
Gonorrea	_____
Chancros	_____
Clamidia	_____
Candidosis	_____
Tricomonas	_____
Otras	_____

26.- Alguno de sus familiares tiene o a tenido algún tipo de cáncer: \_\_\_\_\_

27.- Que parentesco tiene con usted: \_\_\_\_\_

28.- Que tipo de cáncer tiene o tenía su familiar: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

29.- Fuma usted: \_\_\_\_\_

30.- Cuántos cigarrillos fuma diario: \_\_\_\_\_

31.- Cuánto tiempo lleva fumando: \_\_\_\_\_

HORA DE TERMINO DE LA ENTREVISTA: \_\_\_\_\_