

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS
SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL
ESTADO.

HOSPITAL GENERAL “DR. DARIO FERNÁNDEZ FIERRO”

“INCIDENCIA DE TIPOS DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO
MEDIANTE IDENTIFICACION DE DNA VIRAL ESPECÍFICO EN
PACIENTES CON LESIONES CERVICOVAGINALES DEMOSTRABLES
POR COLPOSCOPIA”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN
GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
PRESENTA:

DR. ARMANDO CALDERÓN ANDRADE.



Instituto de Seguridad
y Servicios Sociales
de los Trabajadores
del Estado

México, DF; 2007.



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.



No. De Registro: 401.2006

PROT O C O L O

Unidad Médica o área donde se lleva a cabo la investigación:

Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”

Área de Consulta Externa de Ginecología de Alta Especialidad.

Laboratorio de Histocompatibilidad.

T Í T U L O

**INCIDENCIA DE TIPOS DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO MEDIANTE
IDENTIFICACION DE DNA VIRAL ESPECÍFICO EN PACIENTES CON
LESIONES CERVICOVAGINALES DEMOSTRABLES POR COLPOSCOPIA**

**A U T O R E S D E T E S I S
N O M B R E S Y F I R M A S**

- **Jefe de Enseñanza e Investigación
Dra. Maria Elena García Santos.**

- **Investigador Responsable
Dr. Armando Calderón Andrade**

- **Investigadores Asociados (asesores)
Dr. José Francisco Cervantes
Chávez.**

Dr. Froylán Jiménez Martínez.

- **Titular del Curso de Ginecología y
Obstetricia
Dr. Hantz Yves Ortiz Ortiz.**



II. DEDICATORIA

A Dios.

*Porque haberme prestado la existencia
y por haber sembrado en mí
la invisible fuerza interna
que el ser humano tiene que descubrir:
La vocación.*

A mis padres. Salvador Calderón y Esperanza Andrade.

*A quienes debo no solamente
la existencia como ser humano
sino como hombre
de quienes aprendí los valores universales:
el amor a Dios, a la Patria y al prójimo
y de quienes recibí todo lo que necesité
para ser quien ahora soy.*

A mi esposa Isabel.

*Su presencia, regalo de Dios, es mi felicidad.
Hace años esta hermosa mujer me tomó de la mano
y con ternura me ha llevado por la vida como se lleva a un niño.
Sin ella, yo no sería lo que soy.
Sin ella, yo no sería...*



A mi hermano Salvador.

*Que es como un amigo,
porque con nadie más me hubiera gustado crecer
y conocer las maravillas de la vida juntos
él es mi eterno apoyo incondicional
su generosidad conmigo refleja la enorme bondad de su alma.*

A mis Maestros.

*Por enseñarme que el ser humano
puede utilizar su ciencia y corazón
para ayudar a sus semejantes.
Con cada paciente que esté yo
ellos estarán siempre a mi lado.*

A mis amigos.

*Que son como hermanos.
Porque cuando las vueltas de la vida hagan
que ya no quede nadie
ellos seguirán siempre ahí.*

A mis pacientes.

*Su salud, la razón de mi pasión
Un libro nuevo en cada uno de ellos
A los pasados, presentes y futuros
mi gratitud transformada en absoluta entrega.*

A mis hijos.

*A quienes todavía no conozco
Sin duda el amor más grande de un ser humano
Razón suficiente para todo lo demás.*



III. AGRADECIMIENTOS

- A la **UNAM**, por haberme permitido desde el bachillerato una formación académica íntegra, herramienta de trabajo de por vida.
- Al **ISSSTE**, por permitirme realizar uno de mis sueños más caros: el ser médico especialista, en especial, a mi 2° hogar, el Hospital General “Dr. Darío Fernández Fierro” y a todo el personal que en él laboran.
- A la **Dra. María Elena García Santos**, por su liderazgo en la Enseñanza de calidad en nuestro hospital.
- Al **Dr. José Francisco Cervantes Chávez** por el apoyo y facilidades recibidos para la realización de esta investigación.
- Al **Dr. Froylán Jiménez Martínez**, por su constante apoyo durante mi formación como especialista, y por demostrarme que un gran maestro también puede ser un gran amigo.
- Al **Q.F.B. Guillermo García Castillo**, quien me asesoró y apoyo en el procesamiento de las muestras y desde un principio se mostró entusiasta para la realización de esta investigación.
- Especial agradecimiento a personas que dentro de mi formación, tienen gran valor: **Dr. Alberto Chávez Merlos, Dra. Rocío Inclán Farías, Dra. Sandra Domínguez, Dr. Hantz Ortiz Ortiz, Dr. Isaías Velázquez, Dr. José Antonio Memije, Dr. Juan José Ramírez, Dr. Sergio Moncayo, Dr. Salvador Robert Uribe, Dra. Maricela Mendoza, Dr. Miguel Ángel García, Dra. Mariana López Escamilla, Dra. Laura Mayoral Peña, Dra. Tania Ayala Ruiz, Dra. Silvia Álvarez Maldonado, Dra. Luz Maria Monroy.**



T E S I S

*Incidencia de tipos de Virus de Papiloma Humano mediante
Identificación de DNA viral específico en pacientes con lesiones
cervicovaginales demostrables por colposcopia.*



IV. PENSAMIENTOS

*“El talento se educa en la calma,
el carácter, en la tempestad”*

Voltaire.



V. ÍNDICE

I.	Título y Autores de Tesis.....	2
II.	Dedicatoria.....	3
III.	Agradecimientos.....	5
IV.	Pensamientos.....	6
V.	Índice.....	7
VI.	Introducción.....	9
VII.	Prefacio.....	11
VIII.	Prólogo.....	11
IX.	Resumen o abstract.....	14
X.	Planteamiento del Problema.....	16
XI.	Antecedentes	17
XII.	Objetivos.....	24
	. Objetivo General.....	24
	. Objetivos Específicos.....	24
XIII.	Hipótesis.....	24
XIV.	Justificación.....	25
XV.	Método estadístico.....	25
	• Diseño	25
	• Grupos de estudio.....	25
	• Tamaño de la muestra.....	25
	• Criterios de inclusión.....	26



• Criterios de exclusión.....	26
• Criterios de eliminación	26
• Análisis de datos.....	27
XVI. Resultados y Análisis.....	28
XVII. Discusión.....	33
XVIII. Conclusión.....	35
XIX. Anexo.....	36
XX. Bibliografía.....	37
XXI. Autorizaciones.....	39



VI. INTRODUCCIÓN

La infección por Virus de Papiloma Humano (VPH) actualmente es considerada como una de las más grandes epidemias a nivel mundial. El actual estudio de este agente viral, y sus consecuencias e implicaciones en la salud humana ocupan gran parte de los espacios dedicados a la investigación biomédica.

Está demostrado que la infección por VPH puede producir cambios a nivel del epitelio del aparato genital en el ser humano^(1,2,5). En la mujer, estos cambios se producen en una región anatómica específica: la unión escamo cilíndrica del epitelio cervical, en donde, si se reúnen las condiciones necesarias, se puede originar el cáncer cervicouterino, la 2ª causa de muerte en mujeres a nivel mundial es países en vías de desarrollo, y la 1er causa de muerte en mujeres en nuestro país⁽³⁾.

Los actuales avances y progresos en la ciencia médica nos permiten, con la aparición de las vacunas, prevenir la infección por VPH, en especial de aquellos que poseen elevado potencial oncogénico. Sin embargo, esta profilaxis aún está en etapas muy tempranas como para poder hablar de beneficio significativo, para lo cual, después de la aplicación universal, tendrán que pasar varios años.

En el campo de la detección oportuna se llevan a cabo diversas acciones. La más conocida actualmente es el frotis de Papanicolaou⁽⁴⁾, el cual, además de ser sumamente sencillo de obtener, se realiza en cualquier centro de salud a nivel nacional de manera gratuita, es decir, está al alcance de todas las mujeres que deseen realizárselo. Sin embargo, únicamente nos permite detectar la presencia de lesiones que pueden o no progresar a la malignidad, por lo que la conducta clínica subsecuente en muchas ocasiones es incierta.

Actualmente se dispone de un recurso que permite la detección no solamente de la localización anatómica específica de las lesiones, sino también permite identificar si el



agente causal, el VPH, es considerado de alto o bajo potencial oncogénico, gracias a la combinación del estudio colposcópico⁽¹⁾ y a la identificación del DNA viral específico mediante la ampliación de éste material con la Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR)^(6,10), lo cual nos permite tomar una mejor decisión en el tratamiento de la paciente afectada, ya sea conservador mediante vigilancia estrecha, o radical, mediante las distintas opciones quirúrgicas de las que se dispone para este fin.



VII. P R E F A C I O

La presente tesis de Ginecología y Obstetricia está dirigida a todos aquellos médicos interesados en el conocimiento de la salud integral de la mujer y pretende ser de utilidad a aquellos que busquen recursos más allá de los que actualmente se dispone en nuestra unidad hospitalaria, pero que posee nuestro Instituto.

De antemano sabemos que la patología investigada en esta tesis, la infección por VPH, se aborda desde el primer nivel de atención médica. Sin embargo, muchos médicos, incluso aún en niveles de atención superiores, ignoran los beneficios de la utilización de los recursos de los cuales disponemos, tal vez por falta del conocimiento de su existencia, tal vez por falta de información al respecto.

Nuestro hospital es captante de un gran número de pacientes que acuden a recibir atención relacionada con lesiones intra epitelial cervicales de bajo o alto grado. Sin embargo, muchas de ellas reciben trato no diferencial, es decir, con lesiones de bajo grado se pueden tomar conductas terapéuticas agresivas sin conocimiento pleno de la potencial progresión o regresión de acuerdo a su agente causal. El conocimiento de esta información puede determinar significativamente la conducta subsecuente a realizar proporcionándole al clínico un sustento objetivo para ello.

Asimismo, el conocimiento de una estadística con población no solamente nacional, sino derechohabiente del ISSSTE, nos permitirá tener mejores perspectivas de la situación de ésta patología.

Esta investigación puede ser pionera en el protocolo de atención de la paciente con infección por VPH. Se dispone de la totalidad de los recursos. Todo ello con beneficios no solamente para la paciente, sino para el instituto en general. El lector interesado encontrará un recurso más a su disposición y una base para una mejor decisión terapéutica.

*Dr. Armando Calderón Andrade
Residente de 4° año de Ginecología y Obstetricia*



VIII. PRÓLOGO

El cáncer cervicouterino sigue siendo un problema importante de salud pública entre las mujeres a nivel mundial, especialmente aquellas que viven en países en vías de desarrollo. Aunque esta enfermedad puede evitarse en gran medida, los esfuerzos colectivos para prevenirla no han logrado disminuir significativamente su morbilidad.

Diversos estudios epidemiológicos han identificado la asociación existente entre neoplasia cervical y actividad sexual. El primer estudio que sugería esta asociación tiene ya más de 150 años⁽²⁾. Durante mucho tiempo se ha buscado el agente transmitido por vía sexual responsable del inicio y/o desarrollo de la neoplasia cervical. En las últimas décadas se ha estudiado la asociación entre algunos tipos de Virus de Papiloma Humano (VPH) y ciertas lesiones del cérvix, específicamente el cáncer cervicouterino o sus precursores^(1,2). Hasta el momento se han descrito más de 85 tipos diferentes de VPH, de los cuales aproximadamente 50 han sido aislados de la mucosa anogenital. De los distintos subtipos virales conocidos, más de 20 de estos se han asociado a patología del tracto anogenital. Los tipos de VPH, se han dividido en dos clases mediante estudios epidemiológicos dependiendo de su asociación con el cáncer cervicouterino: tipos de bajo riesgo oncogénico y tipos de alto riesgo oncogénico^(7,8,9).

Clasificación de los diferentes tipos de Virus de Papiloma Humano de acuerdo a su potencial oncogénico.	
Alto riesgo oncogénico:	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82.
Bajo riesgo oncogénico:	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y 89.

Los tipos conocidos como de bajo riesgo son responsables en su mayor parte de lesiones benignas como los condilomas, que raramente se malignizan. Los tipos de alto riesgo se detectan en cánceres intraepiteliales e invasores. Se cree que más del 90% de todos los cánceres cervicales contienen secuencias de VPH de alto riesgo⁽⁵⁾.



Aunque la infección por un VPH de alto riesgo oncogénico es la principal causa de desarrollo de cáncer de cervicouterino, la mayoría de las mujeres infectadas con este tipo de virus no desarrollan ni lesiones de alto grado, ni cáncer cervicouterino⁽¹³⁾.

Los sistemas de amplificación de DNA tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) *in Vitro* se están aplicando para la detección de agentes infecciosos, pues permiten identificar un número pequeño de microorganismos con una altísima especificidad.



IX. RESUMEN

El presente estudio determina la incidencia de los distintos subtipos de Virus de Papiloma Humano (VPH) mediante la identificación del Ácido Desoxirribonucleico (DNA) viral específico mediante técnicas de Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR) en 50 pacientes con lesiones cervicovaginales subclínicas detectadas por colposcopia en el periodo de septiembre de 2006 a febrero de 2007 en el área de consulta de Ginecología de Alta Especialidad del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE.

MATERIAL Y MÉTODO. Se obtiene la incidencia en los resultados del estudio de detección de DNA viral específico para VPH mediante PCR aplicado a 50 pacientes con lesiones cervicovaginales subclínicas detectadas por colposcopia.

RESULTADOS. Nosotros obtuvimos la determinación de tipo viral de VPH mediante PCR a 50 pacientes con antecedentes de lesiones cervicovaginales detectadas previamente por colposcopia, siendo clasificadas de acuerdo al resultado de bajo riesgo oncogénico un 62% de las pacientes, de alto riesgo oncogénico un 22%, e indeterminado un 16%. De los diferentes tipos de VPH se obtuvo una incidencia de 24% de VPH 6, 14% para VPH 11, 8% para VPH 16, 6% para VPH 43 y 18, 4% para VPH 40, 44 y 54, y 2% para VPH 35, 45, 52, 72, 73, 81 y 89.

CONCLUSIONES. La incidencia documentada demuestra que es superior el número de casos de pacientes infectadas con VPH de bajo potencial oncogénico predominando el VPH 6 con un 24%, seguido de VPH 11 con un 14%. Sin embargo, se documentó una incidencia del 22% para pacientes con infección por VPH de alto potencial oncogénico, predominando el VPH 16 con un 8% y el VPH 18 con un 6%.

PALABRAS CLAVE. Virus de Papiloma Humano, DNA, Cadena de Polimerasa, Colposcopia.



ABSTRACT

The present study determines the incidence of the different types of Human Papilloma Virus (HPV) by identifying the specific viral desoxirribonucleic acid (DNA) by Polymerase Chain Reaction (PCR) in 50 patients with subclinic cervicovaginal lesion previously detected by colposcopy in the period of September 2006 to February 2007 in the service of High Specialty Gynecology at the Medical Center “20 de Noviembre”, ISSSTE.

MATERIAL AND METHODS. We obtain the incidence of the results of the detection study of specific HPV DNA by using the PCR determination used in 50 patients with subclinic cervicovaginal lesion detected previously by colposcopy.

RESULTS. We obtained the specific HPV determination by PCR identification to 50 patients with previously detection of subclinic lesion by colposcopy, classifying them according to the results in low oncogenic risk a 62% of the patients, in high oncogenic risk a 22% of the patients, and indeterminated a 16%. Of the different types of HPV we obtained an incidence of 24% to HPV 6, a 124% of HPV 11, 8% to HPV 16, 6% to HPV 43 and 18, 4% to HPV 40, 44 and 54, and 2% to HPV 35, 45, 52, 72, 73, 81 and 89.

CONCLUSION: The documented incidence shows that is superior the number of cases of infected patients with low oncogenic risk HPV, predominating the HPV 6 with a 24%, followed by the HPV 11, with 14%. However, we documented an incidence of 22% for patients with high oncogenic risk HPV infection, predominating the HPV 16 with an 8% and the HPV 18 with a 6%.

KEY WORDS: Papilloma Human Virus, DNA, Polymerase Chain Reaction, Colposcopy.



X. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la incidencia de infección de Virus de papiloma Humano según su serotipo?

¿Cual es la incidencia de los distintos tipos virales de Virus de Papiloma Humano en pacientes con lesiones cervicovaginales colposcópicamente demostrables?

¿Qué beneficio puede otorgar a la población derechohabiente y al ISSSTE el conocimiento de dicha estadística?

¿Con que recursos cuenta el ISSSTE para el conocimiento preciso de dicha infección en población con lesiones cervicovaginales demostrables mediante colposcopia?



XI. ANTECEDENTES

El Virus de Papiloma Humano (VPH) es un agente infeccioso viral, perteneciente a la familia de los *Papovavirus*, los cuales están constituidos por una doble cadena de DNA. Son caracterizados por su pequeño tamaño (50 μm) y por su genoma, cuya longitud alcanza cerca de 8,000 pares de bases, con un peso molecular de 5.2×10^6 dalton. Éstos virus se encuentran envueltos por una cápsula, la cual esta compuesta por 72 subunidades denominadas *capsómeras*, organizadas en una estructura icosaédrica.^(1,2) (figura 1)

Aunque estas partículas virales vistas mediante microscopía electrónica son idénticas, los podemos distinguir por su secuencia de nucleótidos del DNA. Hasta el momento, ha sido posible identificar un número aproximado de 85 subtipos diferentes de VPH sobre la base de la hibridación cruzada molecular^(6,7).

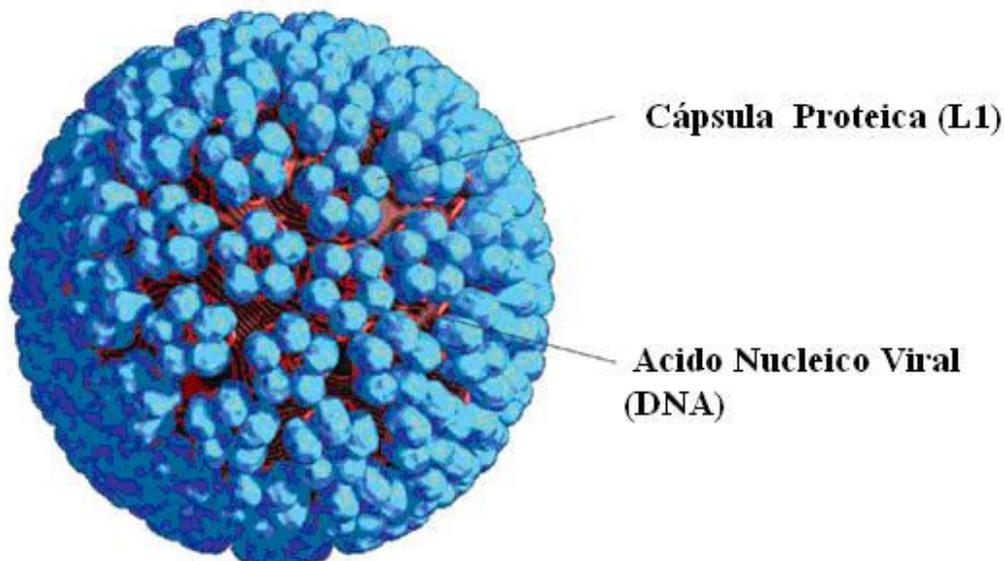


Figura 1. Modelo tridimensional del Virus del Papiloma Humano.



La organización genómica de estos virus parece ser similar. El genoma del virus del papiloma puede dividirse en dos regiones codificadoras separadas por un segmento no codificador, como se muestra en la *figura 2*, donde se representa el VPH 16. La región codificadora “E” (por “*early*”, en inglés, temprana) que representa cerca del 45% del genoma viral contiene los genes E1-E8 necesarios para la replicación viral y para la transformación celular. Los genes E6-E7 están implicados como genes de transformación oncogénica, responsables de los cambios celulares malignos.

La región codificadora “L” (por “*late*”, en inglés, tardía), que representa alrededor el 40% del genoma viral, contiene los genes L1 y L2, que codifican para las proteínas estructurales de la cápside viral. La región no codificadora está localizada entre el término de la región L y el comienzo de la región E, la cual es denominada comúnmente LCR (por “*long control región*”, en inglés, región larga de control) y que representa aproximadamente el 15% del genoma viral la cual interviene en el control de la expresión de los genes virales.

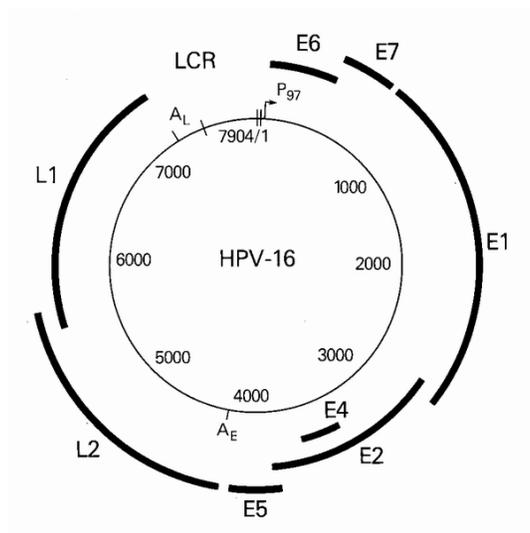


Figura 2. Estructura esquematizada del VPH 16.



La infección por VPH se considera una enfermedad de transmisión sexual (ETS), que, como tal, tiene su mayor incidencia en la edad comprendida entre los 20 y los 40 años, y es más frecuente en individuos con antecedente de promiscuidad sexual. Asimismo, se han descrito algunos factores asociados que influyen en la aparición y desarrollo de lesiones cervicovaginales⁽¹⁾.

La infección por VPH del aparato genital inferior se puede dividir en *clínica*, *subclínica* y *latente*⁽¹⁾.

- **Infección clínica:** Es aquella infección en la cual el diagnóstico se puede realizar a simple vista mediante la observación de lesiones denominadas *Condiloma acuminado*. Los condilomas acuminados son lesiones verrucosas en el tracto genital externo cuya etiología viral es bien conocida y ha sido demostrada en distintos estudios epidemiológicos. Los sitios más comunes donde se pueden apreciar estas lesiones en la mujer son los labios menores y el vestíbulo, y en el hombre el glande, el prepucio, el surco balanoprepucial, y en ambos sexos, la zona anal y perianal. La gran mayoría de estas lesiones están relacionadas con el VPH 6 (65%) y el VPH 11 (20%).
- **Infección subclínica.** Es la forma más frecuente de infección de VPH, especialmente en el cuello uterino. Su diagnóstico se puede realizar únicamente mediante el empleo del colposcopio después de la aplicación de solución acuosa de ácido acético al 5%. Histológicamente se distinguen algunas alteraciones epiteliales típicas tales como hiperplasia del estrato basal, acantosis y alteraciones citopáticas características tales como la presencia de halo coilocítico, picnosis o aumento y homogeneización de la cromatina nuclear, núcleos dobles o múltiples, discrepancia de maduración nucleoplasmática con formación de pequeñas células con citoplasma maduro queratinizado y núcleo picnotico, definidas como *disqueratinocitos*. La infección de VPH del aparato genital inferior puede estar asociada a una neoplasia intraepitelial. En tal caso, se pueden encontrar tres situaciones desde el punto de vista colposcópico e



histológico: 1) presencia de una neoplasia intraepitelial con evidencia de una infección por VPH superpuesta; 2) presencia simultánea, en áreas separadas pero adyacentes, de neoplasia intraepitelial y de infección por VPH, y 3) presencia simultánea de áreas contiguas de neoplasia intraepitelial con infección por VPH superpuesta, y de infección por VPH.

- **Infección latente.** La latencia del VPH es un aspecto fundamental en la biología de este virus. Después del contagio el virus puede desaparecer vencido por las defensas del organismo, o permanecer latente por periodos prolongados. Es desconocido el significado de la infección latente del VPH, pero se sabe que es responsable de la recurrencia después del tratamiento y esta latencia hace imposible el diagnóstico entre recurrencia y reinfección.

Prevalencia.

En el año 2000, se calculó que habría 470.606 casos nuevos y 233.372 defunciones por cáncer cervicouterino al año entre las mujeres de todo el mundo. Además, se calculó que más del 80 por ciento de esta carga se presentaría en los países menos desarrollados, donde esta enfermedad es la principal neoplasia maligna entre las mujeres. En la Región de las Américas, se pronosticaron 92.136 casos y 37.640 defunciones por cáncer cervicouterino, de los cuales 83,9 y 81,2 por ciento corresponderían a América Latina y el Caribe respectivamente⁽¹¹⁾. Hoy en día, el cáncer cervicouterino sigue siendo una causa preponderante de mortalidad en las mujeres a nivel mundial, aunque es la neoplasia con el mayor potencial demostrado de prevención secundaria. Esta enfermedad es totalmente prevenible y curable, a bajo costo y con un bajo riesgo, cuando se cuenta con métodos para tamizaje en mujeres asintomáticas, junto con un diagnóstico, tratamiento y seguimiento apropiados. No obstante, los programas de prevención en América Latina y el Caribe han tenido poco o ningún éxito. En México, donde ha estado en marcha un programa de tamizaje durante más de 20 años, se han evitado menos de 13 por ciento de los casos potencialmente prevenibles. De manera análoga, en Costa Rica, ninguno de los programas de tamizaje implantados desde 1960 ha tenido repercusión sobre la incidencia o la



mortalidad. En Cuba, donde existe un programa de tamizaje desde 1968, se han observado ligeros incrementos en la incidencia y la mortalidad, especialmente entre mujeres jóvenes⁽¹¹⁾.

Otros aspectos relacionados con el VPH y el cáncer cervicouterino representa uno de los pocos cánceres comunes en los cuales se ha identificado un agente causal específico⁽⁵⁾. Sería sumamente útil poder realizar un tamizaje y diagnosticar a las mujeres infectadas por tipos de VPH de alto riesgo, ya que ello facilitaría una vigilancia más estrecha de aquellas persistentemente infectadas, incluso las que tienen una citología normal del cuello uterino. En consecuencia, se están concentrando grandes esfuerzos en el desarrollo comercial de métodos rápidos y económicos para la detección del VPH que ofrezcan mediciones excelentes de desempeño. Además, hay en marcha otras investigaciones para identificar marcadores biológicos que permitan predecir mejor qué pacientes tienen riesgo de presentar lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado. También se está realizando una intensa labor en el terreno de la inmunología de la infección por el VPH y las interacciones entre virus y huésped, especialmente con miras al desarrollo de vacunas y a la producción de sustancias inmunoterapéuticas.

Métodos para la identificación de la infección por VPH.

Los métodos para diagnosticar la infección por VPH son la histología, la colposcopia, la citología, la microscopía electrónica, la inmunohistoquímica, y la biología molecular^(1,2,10,14).

Los sistemas de amplificación de DNA tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) *in Vitro* se están aplicando para la detección de agentes infecciosos, pues permiten identificar un número pequeño de microorganismos con una altísima especificidad. El kit de detección de DNA de VPH por PCR (PVHFast 2.0, Genómica, España) que actualmente se encuentra disponible en el Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ha sido diseñado para la detección y tipado del VPH en distintas muestras clínicas (frotis, suspensiones celulares y tejido fijado en formol e incluido en parafina)⁽¹⁰⁾



mediante amplificación por PCR y posterior digestión del producto amplificado con enzimas de restricción. Cada tipo de VPH presenta en su genoma una secuencia de DNA característica y distinta. No obstante, aparecen zonas dentro de esta secuencia que son muy parecidas entre los distintos tipos de VPH. Con el kit de detección de DNA de VPH por PCR, la detección de VPH se realiza amplificando una región de unos 450 pb del DNA del virus que es muy similar entre los distintos tipos de VPH. Esta región es la denominada L1 del marco abierto de lectura del virus^(1, 7). A pesar de que esta secuencia es común a los distintos tipos de VPH presenta pequeñas variaciones entre unos tipos y otros. Una forma útil de tipar los virus es localizar estas pequeñas variaciones características de cada tipo. Para localizar estas pequeñas variaciones de secuencia y, por tanto, para tipar los diferentes VPH, se digiere el DNA amplificado anteriormente con enzimas de restricción. Las enzimas de restricción, por ejemplo, la enzima Rsa I, cortan en puntos específicos de la secuencia de DNA. De este modo, la enzima cortará el producto amplificado de cada tipo de VPH en distintos puntos originando varios fragmentos de DNA. Si separamos estos fragmentos por su tamaño en un gel de agarosa, cada tipo de virus presentará un patrón de bandas característico⁽⁶⁾. Uno de los inconvenientes de la detección por amplificación genómica son los falsos negativos debidos, bien a una calidad inadecuada del DNA de la muestra (por toma de cantidad insuficiente de muestra, por degradación del DNA debida a una inadecuada conservación o por pérdida del DNA de la muestra durante su extracción), o bien a la presencia de inhibidores de la DNA polimerasa en las muestras en las que se quiere analizar la presencia del virus (hemoglobina, restos de parafina, sales, etc.). Con el kit de detección de DNA de VPH por PCR se han eliminado estos falsos negativos gracias a la introducción de dos controles internos en el mismo tubo de reacción donde se analiza la muestra. Por un lado, la amplificación de DNA del propio paciente presente en la muestra sirve como control del DNA de la muestra. La amplificación del DNA del paciente se lleva a cabo gracias a que todos los tubos de reacción del kit de detección de DNA de VPH por PCR contienen una pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 892 pb del gen humano CFTR. Por otro lado, todos los tubos de reacción del kit de detección de DNA de VPH por PCR contienen un plásmido modificado que sirve como control de la reacción de



amplificación. Este control interno se amplifica con los mismos cebadores que el gen CFTR humano, pero el tamaño del amplificado es distinto (1202 pb). Los dos controles internos se amplifican simultáneamente junto con el VPH en un único tubo de reacción, de manera que al amplificar el DNA extraído a partir de una muestra clínica podemos encontrarnos estas bandas de amplificado:

- Banda de unos 450 pb (variable según corresponde a la amplificación del VPH presente)
- Banda de 892 pb: corresponde a la amplificación paciente (control del DNA de la muestra).
- Banda de 1202 pb: corresponde a la amplificación (control de la reacción de amplificación).

Por lo anterior, se concluye que actualmente la mejor técnica de identificación de VPH por su DNA específico es mediante PCR, lo cual, aunado a la toma de muestras en regiones con lesiones por este agente viral, previamente conocidas por colposcopia, permitirán conocer con mayor exactitud el tipo viral específico infectante.



XII. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Determinar la incidencia de los diferentes tipos de virus de papiloma humano en pacientes con lesiones cervicovaginales producto de la infección por este agente, demostrables por colposcopia, y realizar un análisis estadístico de dicha infección, clasificándolas como de alto y bajo riesgo oncogénico de acuerdo al tipo viral identificado en dichas lesiones mediante el análisis de DNA viral específico.

Objetivos específicos:

- Determinar estadísticamente la incidencia de VPH de acuerdo a su tipo en pacientes con lesiones cervicovaginales de VPH por colposcopia.
- Clasificar de acuerdo a resultado de estudio de identificación de DNA viral por PCR como “pacientes con factor de alto riesgo oncogénico” y “pacientes con factor de bajo riesgo oncogénico.”

XIII. HIPÓTESIS

H1: El estudio de PCR de DNA viral específico permite identificar los distintos tipos de VPH, permitiendo clasificarlos de acuerdo al resultado como “Paciente con factor de alto riesgo oncogénico” y “Paciente con factor de bajo riesgo oncogénico”

H2: El estudio de PCR de DNA viral específico no permite identificar los distintos tipos de VPH, no permitiendo clasificarlos de acuerdo al resultado como “Paciente con factor de alto riesgo oncogénico” y “Paciente con factor de bajo riesgo oncogénico”



XIV. JUSTIFICACIÓN

Debido a la alta morbilidad y mortalidad del cáncer cervicouterino en nuestro país, nuestra institución, al contar con los recursos necesarios para hacer profilaxis o un diagnóstico oportuno de un factor de riesgo determinante como son los tipos de VPH de alto riesgo oncogénico, es posible ofrecer en beneficio de nuestra población derechohabiente con factores de riesgo elevados una atención médica prioritaria y oportuna que le permita recibir tratamiento en etapas tempranas de la enfermedad. Asimismo, en pacientes con factores catalogados como de bajo riesgo oncogénico, evitar conductas terapéuticas agresivas y/o mutilantes y someterla a un riesgo quirúrgico anestésico innecesario.

XV. MÉTODO ESTADÍSTICO

- **Diseño:** Estudio descriptivo, comparativo y estadístico.
- **Grupos de estudio:** 50 pacientes que acuden a consulta externa de Ginecología de Alta especialidad del Centro Médico nacional “20 de Noviembre” para atención de patologías cervicovaginales relacionadas con infección por VPH diagnosticadas mediante colposcopia del periodo comprendido entre septiembre de 2006 a febrero de 2007.
- **Grupo problema:**
 - Pacientes con lesiones cervicovaginales producto de infección por VPH diagnosticadas por colposcopia.
 - Pacientes con resultado positivo a identificación de tipo viral de VPH.
- **Tamaño de la muestra:** Se incluyen 50 pacientes sometidas a colposcopia con una o más lesiones cervicovaginales por infección por VPH que acuden a solicitar atención al módulo de colposcopia de Ginecología de Alta Especialidad del Centro Médico nacional “20 de Noviembre” del periodo de septiembre de 2006 a febrero de 2007



- **Criterios de inclusión.**
 - Pacientes con una o mas lesiones cervicovaginales producto de infección por VPH de cualquier grado detectadas previamente por colposcopia.
 - Que se lleve a cabo por el equipo médico del servicio de consulta externa de Ginecología de Alta Especialidad del Centro Medico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE.
 - Pacientes con resultado positivo para infección por VPH mediante identificación de DNA viral específico por PCR.
 - Durante el periodo de septiembre de 2006 a febrero de 2007.
 - Edad: Cualquier grupo de edad
 - Sexo: Femenino.

- **Criterios de exclusión.**
 - Pacientes sin lesiones cervicovaginales demostrables por colposcopia de infección por VPH.

- **Criterios de eliminación.**
 - Pacientes con resultado negativo a identificación de tipo de VPH mediante técnica de reconocimiento de DNA viral específico.
 -

- **Cédula de recolección de datos :** Ver anexo 1



- **Análisis de datos.**

El grupo de pacientes a estudiar son aquellas pacientes que acuden ya sea por primera vez o subsecuentes a la consulta externa de Ginecología de Alta Especialidad del Centro Médico nacional “20 de Noviembre”, a las cuales, después de habersele practicado estudio colposcópico, se encuentren evidencias de infección subclínica por VPH. Con estos datos, se procederá a realizar la toma de muestra necesaria para realizar el estudio de identificación de DNA viral específico de VPH en el laboratorio de Histocompatibilidad y Genética, lugar donde se lleva a cabo dicho análisis. Una vez realizada la toma de la muestra, se recabarán los datos de interés al estudio tales como las siguientes variables:

- Edad
- Menarca (En años)
- Inicio de vida sexual (IVSA) (en años)
- Número de parejas sexuales.
- Número de embarazos.
- Número de partos.
- Número de cesáreas.
- Número de abortos.
- Método anticonceptivo anterior. (especificar cual o cuales y la duración de cada uno)
- Método anticonceptivo actual.
- Tabaquismo.
- Fecha de último frotis de Papanicolaou.
- Resultado de estudio colposcópico:
 - Localización de la lesión (cérvix o vagina)
 - Tipo de lesión:
 - Papilar.
 - Macular.
 - Micropapular.
 - Condilomatosa.
- Tratamiento(s) previo(s).



XVI. RESULTADOS

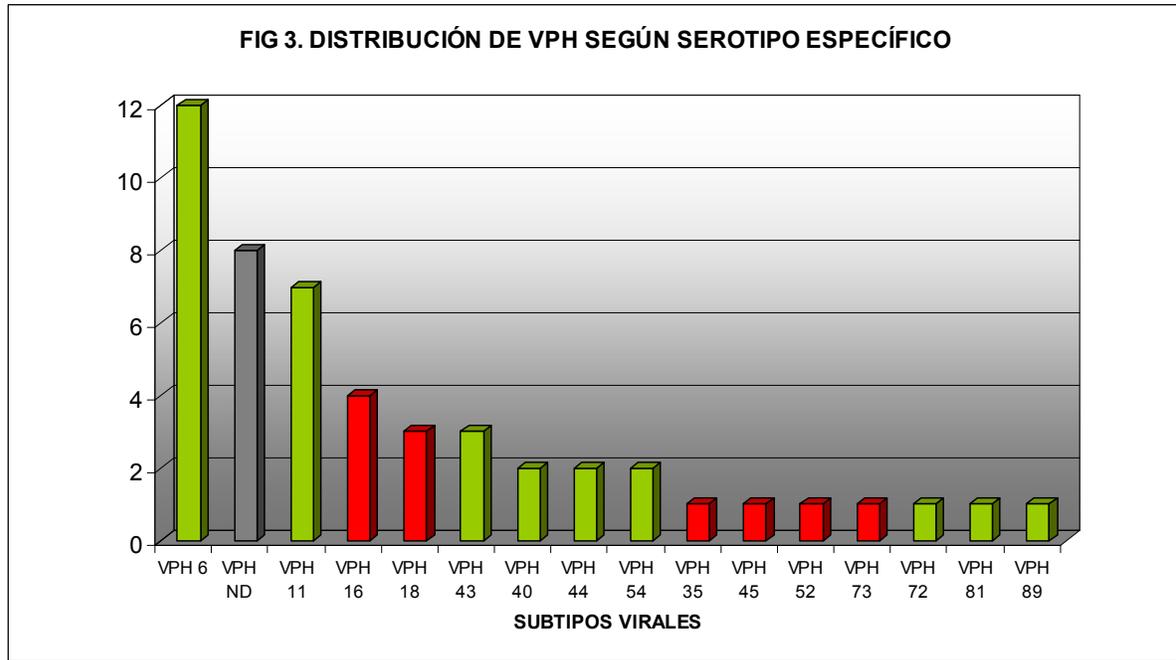
Se estudiaron 50 pacientes con antecedentes de lesiones subclínicas detectadas previamente por colposcopia a las cuales se les tomó muestra cervicovaginal mediante frotis con cepillado con Citobrush, y clasificando los resultados de la siguiente manera:

- De acuerdo a subtipo de VPH
- De acuerdo a clasificación de “VPH con Alto grado riesgo oncogénico” o “VPH con Bajo riesgo oncogénico”

Los resultados fueron los siguientes: (*Fig. 3*)

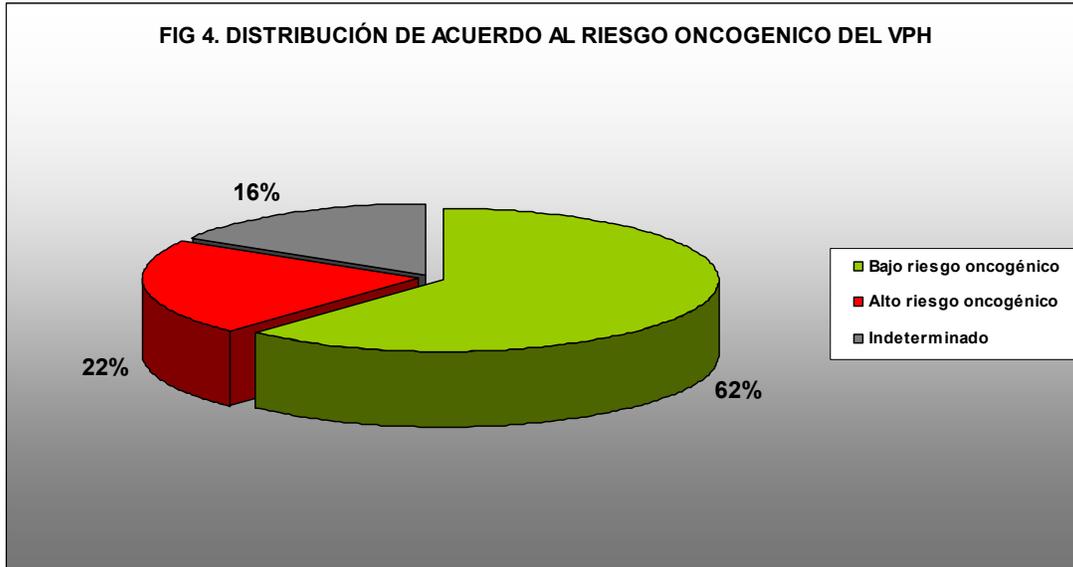
- 12 pacientes con identificación positiva para **VPH 6**
- 8 pacientes con identificación positiva para **VPH indeterminado ***
- 7 pacientes con identificación positiva para **VPH 11**
- 4 pacientes con identificación positiva para **VPH 16**
- 3 pacientes con identificación positiva para **VPH 18**
- 3 pacientes con identificación positiva para **VPH 43**
- 2 pacientes con identificación positiva para **VPH 40**
- 2 pacientes con identificación positiva para **VPH 44**
- 2 pacientes con identificación positiva para **VPH 54**
- 1 paciente con identificación positiva para **VPH 35**
- 1 paciente con identificación positiva para **VPH 45**
- 1 paciente con identificación positiva para **VPH 52**
- 1 paciente con identificación positiva para **VPH 73**
- 1 paciente con identificación positiva para **VPH 72**
- 1 paciente con identificación positiva para **VPH 81**
- 1 paciente con identificación positiva para **VPH 89**

* Identificación positiva para VPH, difícil de determinar serotipo específico por la coexistencia de 2 o más subtipos virales en el momento del estudio.



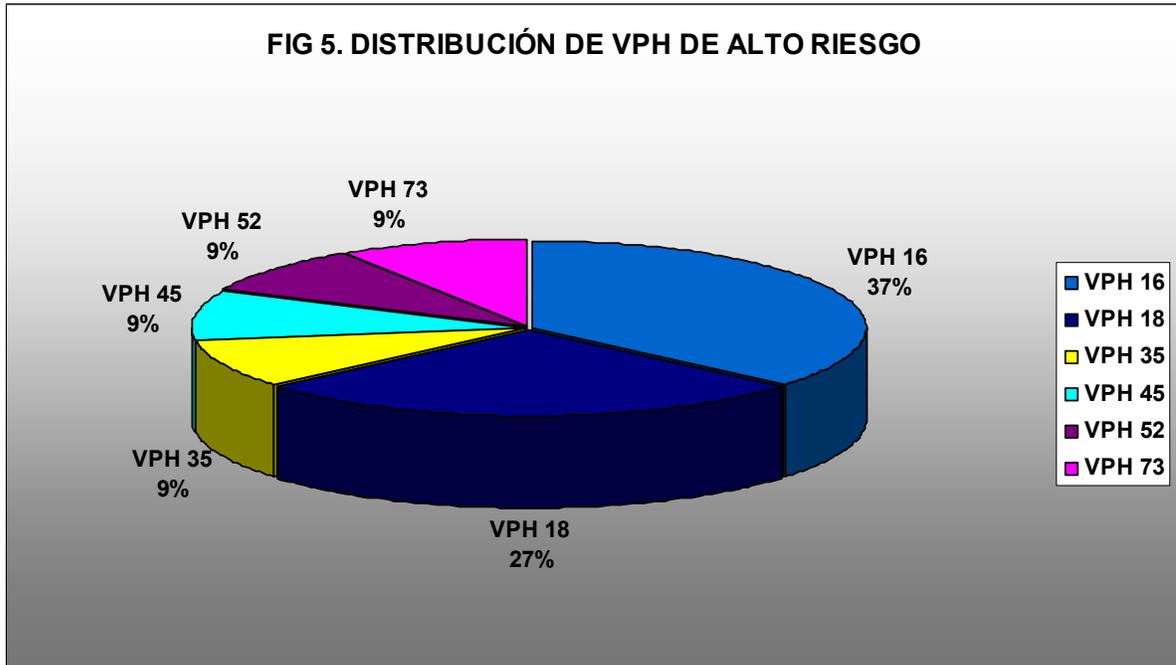
De acuerdo al riesgo oncogénico, los resultados fueron los siguientes: (Fig. 4)

- 31 pacientes (62%) consideradas con infección de VPH de BAJO riesgo oncogénico.
- 11 pacientes (22%) consideradas con infección de VPH de ALTO riesgo oncogénico
- 8 pacientes (16%) consideradas con infección de VPH sin determinar serotipo específico.



De las pacientes con infección de **VPH** considerado de **ALTO** riesgo oncológico se obtuvo la siguiente distribución: (Fig. 5)

- **37%** infectadas con **VPH 16.**
- **27%** infectadas con **VPH 18.**
- **9%** infectadas con **VPH 35.**
- **9%** infectadas con **VPH 45.**
- **9%** infectadas con **VPH 52.**
- **9%** infectadas con **VPH 73.**

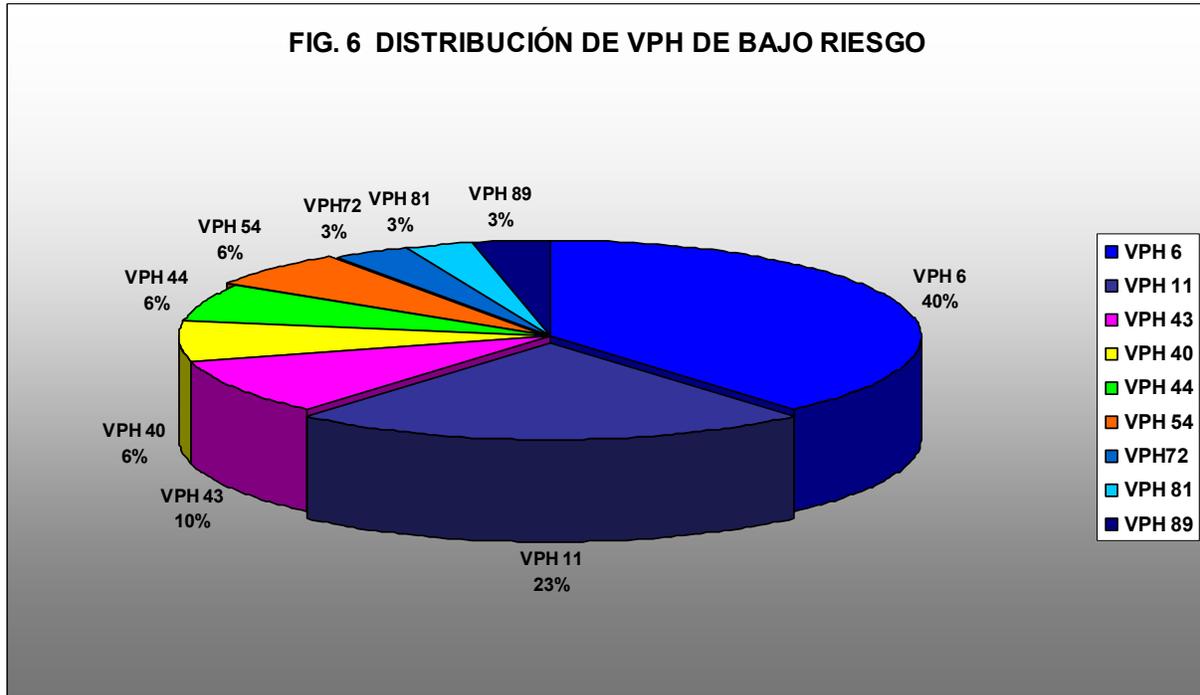


De las pacientes con infección de **VPH** considerado de **BAJO** riesgo oncogénico se obtuvo la siguiente distribución: (Fig. 6)

- **40%** infectadas con **VPH 6**
- **23%** infectadas con **VPH 11**
- **10%** infectadas con **VPH 43**
- **6%** infectadas con **VPH 40**
- **6%** infectadas con **VPH 44**
- **6%** infectadas con **VPH 54**
- **3%** infectadas con **VPH 72**
- **3%** infectadas con **VPH 81**
- **3%** infectadas con **VPH 89**.



FIG. 6 DISTRIBUCIÓN DE VPH DE BAJO RIESGO





XVII. DISCUSIÓN

Es indudable el valor del diagnóstico temprano de las lesiones precursoras del cáncer cervicouterino. Con la llegada del frotis de Papanicolaou se dispuso de una valiosa herramienta para este propósito⁽⁴⁾. Sin embargo, se ha demostrado que el Papanicolaou, como genéricamente se le conoce, posee una alta especificidad (99.2%), pero una baja sensibilidad (de acuerdo al autor, del 62 al 78%)^(1,2,4). Sin embargo, con la utilización de la tecnología, el uso de éste recurso como herramienta única para detección temprana cada vez es menor, ya que actualmente disponemos de tecnología que nos permite visualizar directamente las lesiones producto del VPH, mediante el uso de la colposcopia⁽¹⁾. Esto, aunado a la toma directa de biopsia de lesiones sospechosas, nos permiten una gran certeza con respecto a un diagnóstico correcto y confiable.

Cuando se corrobora la presencia de lesiones de bajo o alto grado, como actualmente se manejan de acuerdo a la clasificación de Bethesda, el manejo casi por lo regular es el mismo, sin distinción, es decir, se trata de la misma manera a una lesión de bajo grado que a una lesión de alto grado: laserterapia, conización o en algunos casos se recurre a la histerectomía total abdominal, procedimiento quirúrgico considerado como mayor, con alto riesgo anestésico y transoperatorio⁽¹³⁾. La toma de la decisión terapéutica óptima para cada paciente en particular se ve influenciada por muchos factores: el estado de la lesión, su localización, la paridad de la paciente, el deseo reproductivo, los antecedentes familiares de la paciente, o inclusive los deseos de la paciente influenciados por el temor a un futuro cáncer. También cabe mencionar que dentro de la práctica médica no son pocos los procedimientos altamente invasivos por temor a situaciones médico legales que pudiesen interpretarse como negligencia médica.

El contar con un recurso extra para la ayuda en la toma de estas decisiones, una vez que se tiene disponible, le da al médico una herramienta más como apoyo en la toma de ésta decisión. Por ejemplo, si se corrobora que se trata de una lesión intraepitelial de bajo grado producto de la infección de un virus de bajo potencial oncogénico, que, de acuerdo a la literatura, pueden remitir hasta en un 70% de los casos, se podría proponer un tratamiento expectante conservador, y así, evitar someter a la paciente a procedimientos invasivos que pondrían en riesgo directamente su salud como en el caso de una cirugía radical.



T E S I S

*Incidencia de tipos de Virus de Papiloma Humano mediante
Identificación de DNA viral específico en pacientes con lesiones
cervicovaginales demostrables por colposcopia.*



En el estudio que llevamos a cabo, se ha demostrado que la infección por VPH de bajo potencial oncogénico casi triplica al número de pacientes infectadas con VPH de alto riesgo oncogénico, lo cual coincide con la literatura latinoamericana revisada, lo cual pone a nuestras pacientes aún con un alto índice de infección por VPH de alto riesgo en comparación con otras regiones como Europa⁽¹²⁾ y América del Norte⁽¹⁴⁾.



XVIII. CONCLUSIÓN

En el estudio que realizamos nos permitió obtener la incidencia de infección por VPH de acuerdo a su subtipo viral específico detectado mediante técnicas de PCR en 50 pacientes. De esta forma nos permitió clasificar a las pacientes como portadoras de virus de alto riesgo oncogénico o bajo riesgo oncogénico. Asimismo, demuestra que hay un predominio en la infección de pacientes con VPH de bajo riesgo oncogénico (31 pacientes, 62%) comparado con las pacientes infectadas con VPH de alto riesgo oncogénico (11 pacientes, 22%). Sin embargo, están sin considerar en esta clasificación las pacientes con resultado de infección por VPH positiva, pero sin determinar serotipo por una probable coinfección de 2 o más tipos de VPH en el momento del estudio (8 pacientes, 16%). El tipo de VPH que obtuvo una incidencia mayor fue el VPH 6 con 12 pacientes (24%) en total, seguido de VPH 11 con 7 pacientes (14%) en total, ambos considerados de bajo riesgo. En tercer lugar tenemos al VPH 16 con 4 pacientes (8%) en total, el cual está considerado de alto riesgo oncogénico. Por lo anterior, podemos considerar a esta prueba clínica como útil para determinar un factor de riesgo adicional muy importante en la historia natural de su enfermedad, y considerarlas como herramienta útil para el momento en la toma de decisiones terapéuticas o de manejo. Actualmente el ISSSTE a través del módulo de Ginecología de Alta Especialidad del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” posee la infraestructura y los recursos suficientes para este propósito. Cabe mencionar que la infección por cualquier tipo de VPH únicamente se considera como un factor de riesgo y de ninguna manera debe ser determinante o considerado como factor único para la toma de decisiones terapéuticas o conducta clínica a seguir, sino que debe ser considerado con todos los demás factores de riesgo y condiciones individuales de cada paciente.

T E S I S



Incidencia de tipos de Virus de Papiloma Humano mediante Identificación de DNA viral específico en pacientes con lesiones cervicovaginales demostrables por colposcopia.



XIX. ANEXOS

Numero: _____



Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado

Subdirección General Médica
Coordinación Nacional de Políticas y Desarrollo Educativo
Departamento de Investigación en Epidemiología y Servicios Médicos

Anexo 1

Formato para el registro de datos del protocolo de tesis

“INCIDENCIA DE TIPOS DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO MEDIANTE IDENTIFICACION DE DNA VIRAL ESPECÍFICO EN PACIENTES CON LESIONES CERVICOVAGINALES DEMOSTRABLES POR COLPOSCOPIA”

Nombre: _____	Fecha: _____
Cédula: _____	Edad: _____
Diagnóstico: _____	

<ul style="list-style-type: none"> • Antecedentes Gineco Obstétricos. 	
Menarca: _____ años.	IVSA: _____ años.
Parejas sexuales: _____	
Gesta: _____ Para: _____	Aborto: _____ Cesareas: _____
Método de planificación familiar:	
Anterior	
Tipo:	Duración:
1. _____	_____
2. _____	_____
3. _____	_____
4. _____	_____
Actual: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	
Fecha de inicio: _____	Tipo: _____
Último Papanicolaou: _____	Fecha: _____
<input type="checkbox"/> Normal.	<input type="checkbox"/> Anormal (especifique) _____

<ul style="list-style-type: none"> • Exploración colposcópica 	
Localización de la lesión	<input type="checkbox"/> Cervical <input type="checkbox"/> Vaginal.
Tipo de lesión	
a) Papilar <input type="checkbox"/>	
b) Macular <input type="checkbox"/>	
c) Micropapular <input type="checkbox"/>	
d) Condilomatosa <input type="checkbox"/>	
Tratamiento previo:	
Tipo de tratamiento:	Fecha:
1. _____	_____
2. _____	_____
3. _____	_____
4. _____	_____



XX. BIBLIOGRAFÍA

1. De Palo Giuseppe, "Colposcopia y patología del tracto genital inferior" 2a edición, editorial Panamericana (2000)
2. DiSaia, Philip J; Creasman, William T. "Oncología Ginecológica Clínica" sexta edición, editorial Mosby (2002)
3. Tirado-Gómez, Laura Leticia; Mohar-Betancourt, Alejandro; "Factores de riesgo de cáncer cervicouterino en mujeres mexicanas" Salud pública de México, Vol. 47, No. 5, Septiembre-Octubre de 2005.
4. Gottlieb S.C; Hawker Peter; "Papillomavirus DNA in smear test raises risk of Cervical Cancer" British Medical Journal, 319, 1454-1459 (1999).
5. Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J., Munoz, N.: "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cáncer worldwide". Journal of Pathology 189, 12-19 (1999).
6. Manos, M.M., Ting, Y., Wright, D.K., Lewis, A.J., Broker, T.R. y Wolinsky, S.M.: "Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus". Cancer Cells 7, 209-214 (1989).
7. Muñoz, N., Bosch, X., Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K.V., Snijders, P.J.F. y Meijer, C.J.L.M.: "Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer". N. Engl. J. Med. 348, 518-527 (2003).
8. Berumen J, Ordonez RM, Lazcano E, Salmeron J, et al: Asian-American Variants of Human Papillomavirus 16 and Risk for Cervical Cancer:A Case-Control Study. Jr. Nat Cancer Inst 93 [17]: 1325-1330, (2001).
9. De Villiers, E.M.: "Heterogeneity of the human papillomavirus group". J. Virol. 63, 4898-4903 (1989).
10. Martínez, A., Nás, R., La Cruz, C., Hellín, T., Tercero, J.C., Valverde, E. y Alemany, J.: "Detección y tipado de papilomavirus humano por amplificación genómica en biopsias, frotis y orina". Acta ginecológica LII, 51-56 (1995).
11. Lewis, Merle J. "Análisis de la situación del Cáncer Cervicouterino en América Latina y el Caribe" Organización Panamericana de la Salud (1-40) (2005).



12. Lacruz Pelea, Cesar; DiMartino Ortiz, Beatriz; “Incidencia de los diferentes tipos de papiloma virus humano en las lesiones escamosas de cuello uterino” Rev Esp Patol, Vol. 36, Num 1, 79-84, (2003).
13. Patti E. Gravitt; Roxanne Jamshidi; “Diagnosis and Management of Oncogenic Cervical Human Papillomavirus Infection” Infect Dis Clin N Am 19 439–458 (2005).
14. Giuliano A.R., Papenfuss M., Abrahamsen M. and Inserra P: Differences in factors associated with oncogenic and nononcogenic Human Papillomavirus infection at the United States-Mexico border. Cancer Epidemiology, Biomarkers, & Prevention 11: 930-934, (2002).



XXI. AUTORIZACIONES

Dr. José Francisco Cervantes Chávez.
Ginecólogo y Obstetra
Jefe del Servicio de Ginecología
Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE

Dr. Froylán Jiménez Martínez.
Ginecólogo y Obstetra.
Servicio de Ginecología y Obstetricia
Hospital General “Dr. Darío Fernández Fierro” ISSSTE

Dr. Hantz Ortiz Ortiz.
Ginecólogo y Obstetra
Titular del curso de Ginecología y Obstetricia
Hospital General “Dr. Darío Fernández Fierro” ISSSTE

Dra. Maria Elena García Santos.
Jefe de Enseñanza e Investigación
Hospital General “Dr. Darío Fernández Fierro” ISSSTE