

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**PETROLEOS MEXICANOS
DIRECCION CORPORATIVA DE SERVICIOS MÉDICOS
GERENCIA DE SERVICIOS DE SALUD
HOSPITAL CENTRAL NORTE DE CONCENTRACION NACIONAL**

**TESIS DE POSTGRADO
PARA OBTENER EL TITULO DE
LA ESPECIALIDAD DE
GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA**

**SEGUIMIENTO MEDIANTE PCR DEL VIRUS DEL PAPILOMA
HUMANO EN PACIENTES CON NIC III POST TRATAMIENTO
CONSERVADOR EN EL HOSPITAL CENTRAL NORTE.**

PRESENTA

Dr. Sergio Ravindranath Domínguez Cortés

**Director de tesis.
Dr. Jorge Zepeda Zaragoza.
Asesor de tesis.
Dr. Benigno Rodríguez Blanco.
Dra. Martha Laura Cruz Islas.**

2009



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.

AUTORIDADES

DR. JAIME ELOY ESTEBAN VAZ
DIRECTOR HOSPITAL CENTRAL NORTE

DRA. MARTHA LAURA CRUZ ISLAS
JEFE DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
HOSPITAL CENTRAL NORTE

DR. JORGE ZEPEDA ZARAGOZA
JEFE DE GINECOOBSTETRICIA
HOSPITAL CENTRAL NORTE

DR. BENIGNO RODRIGUEZ BLANCO
ASESOR DE TESIS

DEDICATORIA

A mis padres a quien amo.

A mi abuela quien siempre me cuido y me apoyo.....y aun lo sigue haciendo.

A mi tía Pita quien sin saberlo despertó en mi la vocación por la medicina y posteriormente mi interés en el estudio de la Ginecoobstetricia.

AGRADECIMIENTOS

Gracias Papá, gracias Mamá por todo su apoyo y todo su amor, por que han sido el trampolín de mi vida, gracias por ser unos padres incondicionales.

A mis hermanos Tulio y Alfa simplemente por ser lo que son mi máximo orgullo.

A mi jefe de servicio, Doctor y Maestro Jorge Zepeda Zaragoza por enseñarme con el ejemplo, gracias por todo su apoyo doctor.

A todos los médicos adscritos que me enseñaron con paciencia y desinteresadamente, de quien tome las armas para mi preparación y formación con esas enseñanzas que me acompañarán en mi práctica profesional el resto de mi vida, Especialmente al Dr. Rubén Ramírez, Dr. Alejandro Martínez Vivaz, Dr. Víctor Hugo Herberth, gracias por su confianza.

Gracias al Dr. Benigno Rodríguez Blanco sin el cual no se hubiese podido llevar acabo este trabajo y a la Lic. Enf. Agustina Ambris por su apoyo.

A mis compañeros de generación con quien emprendí este camino que hoy no termina solo continúa, de quien aprendí cosas más allá de la medicina y gracias por su apoyo a Areli Hernández, Keren Padilla, Adriana Huerta y Carlos Briones.

Gracias a Diana Minerva y Osvaldo Martínez por esa inyección de animo en momentos difíciles.

No puedo dejar de mencionar al personal de enfermería quien siempre nos apoyo con palabras de aliento y motivación en momentos de cansancio brindando una mano amiga y muchas veces acompañada de una taza de café.

Y gracias a todas las pacientes que en esos momentos cruciales de sus vidas nos dieron una mirada de confianza depositando su vida y la de sus hijos en nuestras manos.

INDICE

a. Resumen.....	6
b. Introducción y Marco teórico.....	7
c. Planteamiento del problema.....	17
d. Justificación.....	17
e. Hipótesis.....	18
f. Objetivos. Generales y específicos.....	18
g. Material y métodos.	19
• Tipo y diseño del estudio.....	19
• Criterios de selección.	20
• Calculo del tamaño de la muestra.....	21
• Variables. Definición operacional y Tipo de variables.....	22
• Metodología. Métodos e instrumentos para la recolección de datos.....	24
• Análisis estadístico.....	29
• Consideraciones éticas.....	29
• Ámbito geográfico en el que se desarrollará la investigación.....	29
• Recursos. Humanos, materiales y financieros.....	30
• Cronograma.....	31
h. Resultados.....	32
i. Discusión.....	34
j. Conclusiones	37
k. Referencias Bibliográficas.	38

RESUMEN

La infección del virus del papiloma humano considerada una de las infecciones más frecuentes, su importancia radica en la asociación en el cáncer cervicouterino principal cáncer en países en desarrollo. Las pacientes con neoplasia intraepitelial antesala del cáncer cervicouterino presentan el virus en un 99.7%.

En nuestra población derechohabiente de los servicios médicos de petróleos mexicanos de la clínica de displasias del hospital central norte la neoplasia intraepitelial grado III tiene un índice del 1.1%.

El estudio esta dirigido a pacientes con diagnostico de NIC III que se manejaron con tratamiento conservador mediante cono ASA electroquiurgica o crioterapia a las cuales se les tomo una muestra endocervical para identificación del genoma viral mediante PCR fue negativo en el 86.36% traduciéndose como curación de la lesión ocasionada por VPH y el 13.6 % de las pacientes reportaron presencia de genoma viral siendo los serotipos identificados de alto y mediano riesgo oncogénico.

Concluimos que el manejo conservador es el tratamiento ideal en pacientes con diagnostico de NIC III por tener un alto índice de curación y el estudio mediante PCR viral para identificación de serotipos es de gran ayuda para el seguimiento de las pacientes.

INTRODUCCION.

El VPH es un grupo de virus que infecta epitelios y mucosas del ser humano y se clasifica en tipos de acuerdo con homologías en su material genético. En la actualidad, se reconocen más de 100 tipos diferentes. Un estudio mundial informó la presencia de material genético (ADN) de este virus en más de 95% de casos de CaCu. Posteriormente, mediante técnicas de biología molecular más sensibles, la detección se ha optimizado, hasta obtener 99.7% de positividad al VPH en los tumores analizados. Los tipos del VPH que se encontraron con mayor frecuencia fueron el 16, 18, 31, 33 y 35. El tipo 16 es el responsable de aproximadamente 50% de las infecciones en CaCu mientras que el VPH 18 alcanza 18 a 20%. ⁽¹⁾

La neoplasia intraepitelial cervical es un problema relativamente común en mujeres de edad reproductiva, en la literatura mundial se reporta una incidencia de 1.5 por cada 1000 mujeres de NIC 2 y 3 donde se reporta al NIC 2 como displasia moderada y al NIC 3 como displasia severa o carcinoma in situ. ⁽²⁾

A nivel de diagnóstico, existen diversos métodos que dada la accesibilidad del cuello uterino tanto al estudio tisular y celular, como a la exploración física directa han permitido la investigación extensa de la naturaleza de sus lesiones neoplásicas, sin embargo las lesiones pre malignas son extremadamente difíciles de erradicar, ya que las terapias de que se dispone actualmente están encaminadas a destruir las lesiones visibles mas que atacar la causa subyacente de la enfermedad que son los virus. Aunque no se conoce del todo, diversas investigaciones han demostrado que la mayor parte de los tumores del cáncer cervicouterino tienen un inicio gradual más que agudo, pudiendo existir durante años en una fase reversible durante la cual es posible detectarlo mediante múltiples estudios. ⁽³⁾

Los tratamientos exicionales y ablativos son aceptados como modalidades de tratamiento para mujeres con diagnostico de NIC 2 y 3, con colposcopia satisfactoria. Con seguimiento a los 6 a 12 meses con DNA del VPH. La hysterectomia no es aceptable como tratamiento de primera instancia del NIC II y III. ⁽²⁾

MARCO TEORICO

VIRUS DE PAPILOMA HUMANO Y CANCER CERVICO UTERINO

El virus del papiloma Humano (VPH) generalmente se ha descubierto virtualmente en todos los tumores cervicales los tipos 16, 18, 31, 33, y 45 se identificaron en más del 80%. Sin embargo, el VPH también es el virus más común sexualmente transmitido y está a menudo presente en el epitelio cervical de mujeres que no tienen ninguna anormalidad del citológico. Protegiendo la incidencia se ha reducido substancialmente la mortalidad debido a cáncer cervical, pero los programas preventivos son particularmente difíciles de llevar a cabo en países no industrializados donde la mayoría de cánceres el invasivo es el mas diagnosticado. ⁽⁴⁾

La enfermedad de transmisión sexual (ETS) producida por el virus del papiloma humano (VPH) presenta dos características importantes. En primer lugar, puede identificarse mediante técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y la captura de híbridos (CH). ⁽⁵⁾

Algunos predictores importantes de infección por VPH en mujeres son edad, raza no blanca, alto consumo de bebidas alcohólicas y tabaco, uso de anticonceptivos orales, inició temprano de relaciones sexuales, numero de parejas sexuales, trauma cervical durante el parto, factores genéticos y ciertos factores hormonales endógenos asociados al embarazo. ⁽⁶⁾

Desde hace varias décadas se ha observado la estrecha relación que tiene el cáncer cervicouterino (CaCu) con agentes de transmisión sexual. A finales de los años 70 se centro la atención en el virus del papiloma humano. Posteriormente con el desarrollo de técnicas de biología molecular se pudo demostrar la asociación del VPH con CaCu. ⁽⁷⁾

Son impresionantes los datos recientes respecto al origen del cáncer a nivel molecular y se conocen con más precisión los procesos de progresión, invasión y metástasis tumoral. Todos estos experimentos han podido dilucidar algunos factores potenciadores o estimuladores para la aparición de esta enfermedad. ⁽⁸⁾

Estudios epidemiológicos han mostrado consistentemente que las pruebas de determinación de ADN de VPH son más sensibles que la citología repetida para la identificación de lesiones de alto grado en mujeres con diagnóstico de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS). Diversos estudios que evalúan el tamizaje primario en CaCu, han mostrado que la sensibilidad de las pruebas de VPH es más alta que la citología estándar para detectar lesiones de alto grado, donde la especificidad es similar sólo en mujeres con edades entre 30 y 35 años o mayores. ⁽⁹⁾

El CaCu esta precedido de una serie de alteraciones celulares en el epitelio cervical denominada neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Actualmente se acepta que el virus del papiloma humano es el principal agente etiológico infeccioso asociado a CaCu y a la NIC. Esta asociación es particularmente importante con los tipos de VPH que se han denominado de alto riesgo (VPH-AR), principalmente VPH 16, 18, 31, 33, 35, 52, 56 y 58. Estos tipos de VPH-AR se han detectado en más de 90% del cáncer invasor y entre 80 y 90% de los casos de NIC. Los tipos virales mas comúnmente asociados con estas lesiones son el VPH-16 (50-55%) y VPH 18 (15-20%) Se considera que la persistencia del VPH AR conduce a la progresión de las lesiones cervicales. La diferencia entre una alta prevalencia de la infección por VPH (11-80%) en mujeres sanas jóvenes, la baja incidencia de NIC y progresión de infecciones, apoya la hipótesis de que el VPH puede ser una

causa necesaria, pero insuficiente para explicar, la presencia de NIC y cáncer invasor. La presencia de VPH parece explicar muchos de los factores de riesgo establecidos para neoplasia cervical incluyendo el comportamiento sexual y el tabaquismo. En la población de mujeres mexicanas son pocos los estudios que hacen referencia a la frecuencia o asociación entre la infección del VPH y NIC. ⁽¹⁰⁾

A partir de la década de los años ochenta se ha identificado al virus del papiloma humano como una causa necesaria pero no suficiente para desarrollar la enfermedad. En años recientes se ha notificado la existencia de más de 100 tipos de VPH, siendo las variantes 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 las consideradas como de alto riesgo, por encontrarse asociadas al CaCu en más de 95% de los casos. Por otra parte, se informa que otros tipos de VPH, como el 6, 11, 42, 43 y 44 muestran una débil asociación con CaCu denominándose por tanto, tipos de bajo riesgo. Otros factores deben coincidir con el VPH, ya que se notifica una prevalencia de 38% de infección por VPH en mujeres sanas jóvenes, misma que puede remitir con el tiempo. Entre esos factores se encuentran el nivel socioeconómico bajo; el inicio temprano de la vida sexual; el antecedente de haber tenido dos o más parejas sexuales; la edad temprana del primer embarazo; tres o más partos; el uso de anticonceptivos hormonales, y el tabaquismo. Otra situación que debe considerarse es la intensidad de la infección. ⁽¹¹⁾

Los tipos 33, 39 y 59 se encuentran en mayor proporción en América Central y del Sur. En México los tipos oncogénicos más frecuentes son el 16 y 18, El VPH cervical estudiado mediante la técnica en reacción de cadena de polimerasa presenta una prevalencia máxima entre los 20 y 25 años de edad aproximadamente el 10% de las mujeres con VPH positivo presentan alteraciones citológicas en el cérvix la prevalencia de mujeres jóvenes sin actividad sexual con VPH en cérvix es de 20%, mientras que las mujeres sexualmente activas es de 60%. ⁽¹²⁾

Las infecciones genitales por VPH tienen alta prevalencia (20 a 40%) en grupos etáreos con actividad sexual. muchos de ellos (80 a 90%) se mantienen no

evidentes desde el punto de vista clínico pero, es posible que contribuyan a la diseminación viral. Si aparecen lesiones las características clínicas, el aspecto histológico y la evolución natural están muy determinados por el tipo de VPH. Los tipos 6 y 11 principalmente producen condilomas exofíticos que afectan la piel ano genital y la porción inferior de la vagina. Además, los tipos 6 y 11, así como los 16, 18, 30, 31, 33, 35, 39, 42 al 45, 51, 52, 56, 58 y 61 se detectan en condilomas planos y lesiones de NIC grado I, que tienen las mismas características de acantosis basal y coilocitosis superficial de los condilomas, solo un subgrupo de estos tipos de VPH (16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 55, 56, 58 y 61) que se consideran virus de medio a alto riesgo, prevalecen en las lesiones de NIC grados II y III. Ocurren atípicas nucleares en todas las capas de estas displasias mas graves y se observan mitosis anormales. Tipos de VPH adicionales, como 26, 34, 40, 54, 55, 57, 59, 62, 64 y 67 a 70 se han encontrado en unos cuantos casos de condilomas y neoplasias intraepiteliales vulgares, penianos y cervicouterinos. ⁽³⁾

NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL

La transfección (introducción de información genética) de un virus al genoma de queratinocitos humanos con VPH 16 induce características histológicas de neoplasia intraepitelial, cuando se cultivan las células en medios órgano típicos que permiten la formación de un epitelio estratificado. La histología recuerda a la displasia leve (NIC I) al principio y que corresponde con la del carcinoma in situ después de varios pasos in vitro. Estudios prospectivos de mujeres con pruebas citológicas inicialmente negativas demostraron que la incidencia acumulativa de NIC a los 2 años era de 28% en aquellas con una prueba positiva para VPH en comparación con 3% en quienes fueron negativas. Las infecciones por VPH 16 o 18 se vincularon con un riesgo relativo para la aparición de NIC. Mas de la mitad de las mujeres tuvo NIC II o III sin NIC I intermedio, lo que indica que las infecciones por el virus de mas alto riesgo pudieran rápidamente causar grados mas graves de NIC. El avance hasta la

enfermedad de alto grado a partir de lesiones de bajo grado ocurre de preferencia en pacientes con VPH de alto riesgo. La NIC I por supuesto constituye dos entidades: 1) la manifestación preferencial, sobre todo autolimitada de infecciones por virus como VPH 6, 11, 42, 43, o 44 y 2) la manifestación temprana de infecciones por VPH 16 o 18 o virus relacionados con un alto riesgo de avance. ⁽³⁾

NIC es el término empleado hoy en día para referirse a todas las anomalías epiteliales del cuello uterino. Las células epiteliales son neoplásicas pero están confinadas al epitelio. La terminología antigua que empleaba los términos displasia y carcinoma in situ connota la existencia de dos grupos dentro del mismo proceso, echo que, al menos en el pasado, ha tenido su impacto, sobre el tratamiento, es decir, si solo se trataba de displasia, el tratamiento era innecesario o limitado. Si se diagnosticaba carcinoma in situ en muchos casos se recomendaba la histerectomía. Este concepto es inadecuado, especialmente cuando el epitelio cervical puede no tener mas de 0.25 mm de grosor aunque se ha dividido la NIC de forma arbitraria en 3 niveles, esta entidad parece constituir un único espectro neoplásico continuo. Los criterios histológicos para llegar al diagnostico de NIC dependen del hallazgo aneuploidia nuclear, figuras mitóticas anormales y perdida de maduración normal de epitelio. La NIC se divide en grados I, II o III dependiendo de la extensión de la aberración de la estratificación celular dentro del epitelio. En la NIC I esta afectado el tercio inferior del espesor del epitelio, en la NIC II están afectados los tercios inferior y medio del espesor del epitelio. La NIC III están afectados los tres tercios del epitelio, la NIC III presentan cambios de espesor total con células indiferenciadas no estratificadas. (NIC III es el carcinoma in situ). El pleomorfismo nuclear resulta frecuente y las figuras mitóticas son anormales. Basándose en estudios de ADN nuclear, algunos investigadores han sugerido que la mayor parte de las lesiones diagnosticadas de NIC I son de hecho condilomas planos que convierten virus del papiloma humano 6 y 11. ⁽¹³⁾

Resulta interesante que la mayoría (mas del 70 %) de los casos de NIC de todos los grados, se asocian a VPH de alto riesgo. Entre el 10 y el 15 % de las

mujeres con citologías normales son portadora de VPH de alto riesgo y de ellas alrededor del 10 % terminan por manifestar una NIC de alto grado. ⁽¹⁴⁾

Dentro de la literatura Nacional se reporta la prevalencia de NIC I de 9.5%, NIC II 0.51% y la de NIC III en 0.051%. ⁽¹⁵⁾

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por [Kary Mullis](#), cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original o molde. Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que, tras la amplificación, resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad virus o bacterias causantes de una enfermedad o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado. Estos usos derivados de la amplificación han hecho que se convierta en una técnica muy extendida, con el consiguiente abaratamiento del equipo necesario para llevarla a cabo. Por lo general, la PCR es una técnica común y normalmente indispensable en laboratorios de investigación médica y biológica para una gran variedad de aplicaciones. Entre ellas se incluyen la clonación de ADN para la secuenciación, la filogenia basada en ADN, el análisis funcional de genes, el diagnóstico de trastornos hereditarios, la identificación de huellas genéticas (usada en técnicas forenses y test de paternidad) y la detección y diagnóstico de enfermedades infecciosas. ⁽¹⁶⁾

En medicina la PCR se emplea fundamentalmente como herramienta de diagnóstico; Permite el genotipar la especie o especies que provocan un determinado cuadro infeccioso: para ello, se amplifica una zona del genoma bacteriano cuyo producto de PCR posea unas características de tamaño o temperatura de fusión que permitan identificarlo de forma inequívoca. En el caso

de infecciones virales que implican la integración del genoma del patógeno en el ADN del hospedador, como es el de la infección por VIH la PCR cuantitativa posibilita la determinación de la carga viral existente y por tanto, del estadio de la enfermedad. La PCR también se puede usar en revisiones médicas rutinarias, como en los servicios de donantes de sangre, para test de rutina. A través de esta técnica se pueden detectar infecciones peligrosas en el donante (como VIH o Hepatitis B) mientras aún están en el periodo de incubación. Dada la sensibilidad de los test de PCR se pueden tomar muestras colectivas o "pools" (por ejemplo, 96 pruebas individuales). Si una de estas muestras colectivas da positivo, se toman a partir de ella muestras progresivamente menores hasta que se encuentra el causante. ^(17, 18)

SISTEMA				
BETHESDA	NORMAL	CAMBIOS CELULARES BENIGNOS, CAMBIOS REACTIVOS POR INFECCION , INFLAMACION, ATROFIA, IRRADIACION, ETC.	<ul style="list-style-type: none"> • ASCUS • LIEBGM • VPH • NIC I 	<ul style="list-style-type: none"> • AGUS • LIEAGM • NIC II • NIC III
RICHART NIC	NORMAL	ATIPIA INFLAMATORIA (ORGANISMO)	<ul style="list-style-type: none"> • ATIPIA ESCAMOSA • COILOCITOSIS • NIC I 	<ul style="list-style-type: none"> • NIC II • NIC III
REAGAN DISPLASIA	NORMAL	ATIPIA BENIGNA	<ul style="list-style-type: none"> • CELULAS ATIPICAS • DISPLASIA LEVE 	<ul style="list-style-type: none"> • DISPLASIA MODERADA • DISPLASIA SEVERA • Ca IN SITU

LIEBGM. Lesión intraepitelial de bajo grado de malignidad.

LIEAGM. Lesión intraepitelial de alto grado de malignidad.

ASCUS. Células escamosas atípicas de significado incierto.

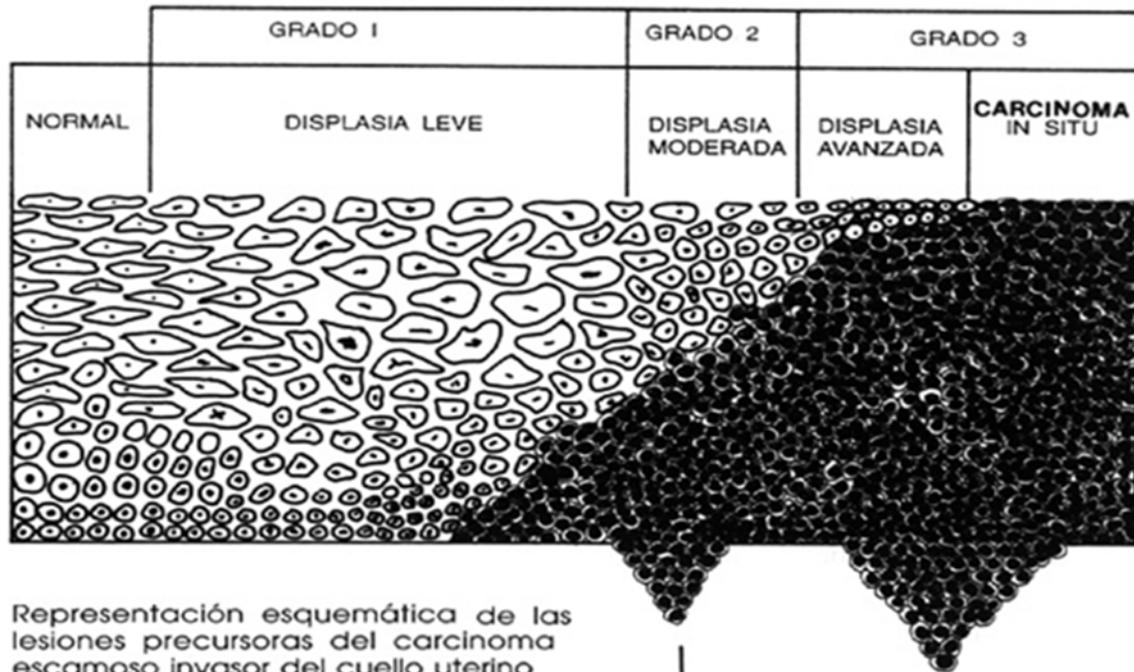
AGUS. Células glandulares atípicas de significado incierto.

Índices de Regresión Espontánea, Persistencia y Progresión de NIC

	NIC I	NIC II	NIC III
Regresión a la normalidad	60%	40%	30%
Persistencia	30%	35%	48%
Progresión a NIC III	10%	20%	---
Progresión a CA	<1%	5%	22%

Current de GO, 2003

Neoplasia Intraepitelial Cervical



Representación esquemática de las lesiones precursoras del carcinoma escamoso invasor del cuello uterino (según Kurman (Editor) (1987) Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract, Springer, New York; modificado)

CARCINOMA INVASOR

PL ANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El manejo conservador mediante la electrocirugía CONO / ASA o la Crioterapia es un tratamiento adecuado y efectivo para curación y erradicación de las lesiones de alto grado como la Neoplasia Intraepitelial grado III secundarias a virus del papiloma humano a nivel del cérvix, haciendo el seguimiento con la PCR del virus siendo esta prueba de las mas confiables para demostrar y tipificar el serotipo viral y su evolución.

JUSTIFICACION

Los estadios finales de la NICIII son la antesala del cáncer cervicouterino y que algunos de los subtipos del virus del papiloma humano tienen una fuerte relación causa-efecto con dicha patología, el cáncer cervicouterino en etapa in situ es totalmente curable en porcentajes prácticamente del 100% siendo la electrocirugía y la crioterapia métodos conservadores de tratamiento en pacientes jóvenes aun en vida reproductiva o simplemente en mujeres que desean la conservación del útero los tratamientos de primera elección.

La PCR es un estudio sofisticado de lo último al alcance para el diagnóstico del virus del papiloma humano, sirve para conocer el tipo de virus en cada paciente y nos da un valor predictivo respecto al potencial de malignización.

En nuestro estudio esperamos que el porcentaje de curación en nuestras pacientes con lesiones de NIC III con tratamiento conservador sea alto corroborado por la PCR viral siendo este de los métodos de mayor confiabilidad para el diagnóstico de VPH y tener en cuenta el subtipo para valorar pronóstico y conducta a seguir.

HIPOTESIS

El tratamiento conservador mediante CONIZACIÓN CERVICAL CON ASA ELECTROQUIRÚRGICA y la crioterapia son lo suficiente efectivos para una alta curación del las pacientes con NIC III, siendo corroborado con uno de los métodos mas sofisticados y nuevos para la detección del virus del papiloma humano.

La tipificación viral nos da un pronóstico para el manejo de las pacientes con lesión y persistencia del virus del papiloma humano.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluación de las pacientes con antecedente de NIC III secundaria al virus del papiloma humano que se manejaron conservadoramente, comprobando mediante la PCR la curación de la lesión y utilizar la tipificación viral para el pronóstico y un mejor manejo oportuno en pacientes en quienes persista la infección del virus.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a) Seguimiento con PCR de las pacientes con antecedente de NICIII secundaria a VPH
- b) Evaluar el número de pacientes con curación completa de la lesión solo con manejo conservador.
- c) Utilización de la tipificación viral para pronóstico y tratamiento subsecuente.

MATERIAL Y METODOS

TIPO DE ESTUDIO:

PROSPECTIVO

TRANSVERSAL

DESCRIPTIVO

OBSERVACIONAL

POBLACIÓN, LUGAR Y TIEMPO

Población: Pacientes censadas en la Clínica de Displasias del servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Central Norte de los servicios médicos de PEMEX

Lugar: Hospital Central Norte

Tiempo de estudio: 4 meses, del 1 de marzo al 30 de junio del 2008.

CRITERIOS DE INCLUSION

- Pacientes con antecedente de NICIII secundaria al virus del papiloma humano que hallan sido tratadas mediante Conización cervical con asa electro quirúrgica y/o Crioterapia
- Mujeres censadas de la Clínica de Displasias del servicio de Ginecología y Obstétrica del Hospital Central Norte
- Ser derechohabiente de los servicios médicos de petróleos mexicanos

CRITERIOS DE EXCLUSION

- Antecedente de NIC III con Histerectomía total abdominal o vaginal
- Pacientes manejadas con radioterapia o antineoplásicos
- Pacientes con cáncer invasor
- No estar en condición física para realizar la toma de muestra.

CALCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

$$n = \frac{NZ^2 pq}{d^2 (N-1) + Z^2 pq}$$

Descripción:

n = tamaño de la muestra requerido

p = prevalencia estimada

d = margen de error de 5% (valor estándar de 0,05)

z = (1.96)

q = (1- p)

N= población total

DESCRIPCION DE VARIABLES

VARIABLE INDEPENDIENTE

Variable cualitativa nominal

Modalidad terapéutica:

A) electrocirugía cono ASA

B) crioterapia

VARIABLE DEPENDIENTE

Variable cualitativa nominal

Material genético de virus del papiloma humano detectado por PCR

VARIABLE DEMOGRÁFICA

NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL III

LUGAR DE RESIDENCIA.

CODIFICACION DE DERECHOHABIENCIA

DEFINICION DE LAS VARIABLES.

Electrocirugía cono ASA: Es el procedimiento terapéutico-diagnostico mediante el cual se practica en el cuello uterino una incisión en forma de cono, utilizando bisturí electroquirúrgico de energía monopolar, para hacer la exéresis de procesos patológicos que engloben tanto el exocervix como el endocervix, de etiología variada.

Crioterapia: consiste en la destrucción del tejido mediante la aplicación directa de frío intenso con nitrógeno líquido (-196°C). Tiene la ventaja de que se hace sin anestesia, es indolora, no requiere una preparación especial de la paciente.

PCR (reacción en cadena de la polimerasa): técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo.

PCR (reacción en cadena de la polimerasa): es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular.

Neoplasia intraepitelial cervical III: afección de los tres tercios del epitelio cervical por células neoplásicas.

Lugar de residencia: zona geográfica donde habita la paciente

Codificación de derechohabiencia: nos dice si la paciente es empleada de petróleos mexicanos o esposa de trabajador de la empresa con los números 00 y 08 respectivamente.

METODOLOGIA.

De un total de 5629 pacientes censadas y en control en la clínica de displasias del servicio de ginecología y obstetricia del hospital central norte de los servicios médicos de petróleos mexicanos de enero de 1998 a abril 2008; se seleccionaron aquellas con diagnóstico de NIC III y que hubieran sido tratadas con manejo conservador : como ASA electroquirúrgica y/o crioterapia sin importar la edad de las pacientes ni el tiempo de realización del tratamiento: 64 pacientes. Se excluyeron 30 pacientes ya que habían sido sometidas a histerectomía por otras causas, 12 pacientes no se localizaron.

A través del personal de trabajo social del hospital central norte y con la colaboración de trabajo social del hospital general de Tula para las pacientes que son referidas a tercer nivel, se localizo e invito a cada una de las pacientes a participar en el protocolo de investigación. Previa información de las características del estudio se incluyeron y aceptaron 22 pacientes quienes firmaron consentimiento de información y participación.

METODOS E INSTRUMENTOS PARALA RECOLECCION DE DATOS

TÉCNICA PARA LA TOMA DE MUESTRA EN EL CONSULTORIO DE LA CLINICA DE DISPLASIAS.

Con la Paciente en posición de litotomía se coloca especulo vaginal desechable se toma muestra con citobrush del orificio cervical, se coloca en tubo de ensayo con 2 ml. de solución salina con sello y se mantiene en refrigeración la muestra para su envío al laboratorio de biología molecular de los servicios médicos de petróleos mexicanos donde se identifica y tipifica serotipos del virus del papiloma humano.

DETECCIÓN Y TIPADO DE PAPILOMA VIRUS HUMANO POR IDENTIFICACIÓN GENÓMICA Y PCR UTILIZADO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DEL HOSPITAL CENTRAL SUR DE ALTA ESPECIALIDAD DE LOS SERVICIOS MEDICOS DE PETROLEOS MEXICANOS.

En esta prueba se amplifica un fragmento de DNA de aproximadamente 450 pb (variable según el tipo de virus) dentro de la región LI (Late 1) del marco abierto de lectura (ORF) del virus. Esta región de DNA contiene secuencias altamente conservadas, pero presenta secuencias distintivas identificables por enzimas de restricción lo cual permite identificar los diferentes biotipos mediante RFLP's

EXTRACCIÓN DEL DNA DE VPH A PARTIR DE MUESTRA TOMA CON HISOPO o CITOBRUSH

Se añade 1.5 ml de solución salina isotónica (cloruro sódico 0.9%) al tubo que contiene el hisopo y se agita durante 1 minuto.

Se decanta el sobrenadante en un tubo Eppendorf de 1.5 ml autoclavado y se centrifuga durante 10 minutos a máxima velocidad, Se Quita el sobrenadante Luego se resuspende el precipitado en 50 μ L de solución de digestión y 50 μ L de proteinasa K Incubado entre 55 a 60°C durante 2 a 3 horas para Calentar entre 96 a 100 °C durante 10 minutos y con esto inactivar la proteinasa K.

Se Centrifuga a máxima velocidad (15,000 rpm) durante 10 minutos. Pasando inmediatamente el sobrenadante a un tubo limpio y tomar una alícuota de 5 μ L para realizar la reacción de amplificación.

REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN

Se descongela el tubo de reacción por cada muestra que se va a estudiar y conservar en hielo. Añadir 5 uL del DNA extraído de las muestras.

Arrancar el programa "HPV FAST" y colocar los tubos de reacción en el termociclador cuando el bloque haya alcanzado los 90°C. De este modo se minimizan las posibles amplificaciones inespecíficas debidas a incubación por debajo de la temperatura de hibridación. La duración de la amplificación es aproximadamente de 4 horas.

Los resultados que podemos obtener son:

Una muestra será positiva para la presencia de PVH cuando:

- Aparece una banda de 450 pb correspondientes al genoma de PVH y además
- Aparece una banda de 1200 pb correspondiente al control interno. En muestras con un elevado número de copias de virus, no se detectará esta banda correspondiente al control interno, ya que el amplificado de PVH compite con el de control interno. En algunos casos pueden aparecer dos bandas tenues de aproximadamente 300 y 600 pb que corresponden a DNA de cadena sencilla resultantes de la amplificación de PVH y del control interno respectivamente. Estas bandas no interfieren con los resultados y no se han de tener en cuenta.

Una muestra será negativa para la presencia de PVH cuando:

- Aparezca solamente una banda de 1200 pb correspondiente al control interno. Al igual que se indicó anteriormente, en algunos casos, puede aparecer una banda tenue de aproximadamente 600 pb que corresponden a DNA de cadena sencilla resultantes de la amplificación del control interno. Esta banda no interfiere con los resultados y no se ha de tener en cuenta.
- La reacción de amplificación de una muestra estará inhibida cuando no aparezca ninguna banda.
- En el tubo control negativo aparecerá únicamente la banda de 1200 pb correspondiente al control interno. La reacción de amplificación estará contaminada si en el control negativo aparece la banda de 450 pb correspondiente al genoma PVH. Esto indica que ha habido contaminación al realizar el proceso de extracción de DNA.

TIPADO POR DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN. (RFLP)

1. - Centrifugar unos segundos los tubos de Enzima de han de estar siempre a – 20°C
2. - Tomar los tubos de reacción amplificados anteriormente de las muestras positivas para PVH y añadir a cada uno de ellos 1 ul de Enzima 1 de restricción atravesando la capa de aceite. Resuspende suavemente con ayuda de la micropipeta y marcar estos tubos como Dig 1 (digestión Enzima 1)
3. - Resuspender de nuevo con la micropipeta 2 – 3 veces y pasar 20 uL de cada uno a un tubo Eppendorf limpio de 1.5 mL marcado con el número de muestra y Dig 1 + 2 (digestión enzima 1 + enzima 2. Añadirle a estos tubos 0.5 – 1 uL de enzima 2 de restricción y resuspender de nuevo suavemente con ayuda de la micropipeta.
4. - Incubar los tubos, los de la digestión con la enzima 1 (Dig 1) y los de la digestión con las enzimas 2 (Dig 1 + 2) en un baño o estufa a 37°C durante 2 hrs.
5. -Añadirles a cada uno de los tubos de las dos digestiones 3 ul de Solución de carga y cargar 15 ul de cada uno en un gel de agarosa de alta resolución al 2.5% en TBE IX. Utilizar como marcador de peso molecular 0.5 ug de DNA Molecular Weight Marker VIII. Correr la electroforesis a 8 V/cm (80 V para un gel de 10 cm de largo) hasta que el colorante que avanza más rápido, el azul de bromofenol llegue al final del gel.

INTERPRETACIÓN DE LAS MUESTRAS

1. - MUESTRAS POSITIVAS: Al incubar el amplificador de una muestra positiva para PVH con la Enzima 1 la Enzima 1 + 2, la banda de 450 pb se digierá originando un patrón de bandas dependiendo del tipo de virus. El tipo se identifica comparando los patrones obtenidos en la electroforesis de las dos digestiones con los del esquema que se adjunta al final de este protocolo.

Normalmente las bandas menores de 65 pb no son visibles en el gel debido a su pequeño tamaño.

En algunas muestras puede aparecer una banda a la altura indicada en la figura 1 que está formada por dímeros de los iniciadores, por lo que no se debe tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados.

- Además del patrón de bandas del virus aparecerán dos bandas de 550 y 650 pb correspondientes a la digestión de la banda de 1200 pb, del control interno.
- Pueden aparecer patrones distintos a los indicados en el esquema, debido a la presencia de un PVH cuya secuencia no está depositada en el GeneBank o debido a la presencia de dos o más tipos de PVH simultáneamente en la misma muestra, apareciendo superpuestos los patrones resultantes de la digestión de todos ellos.

2. - MUESTRAS NEGATIVAS: Si se digiere una muestra negativa para PVH aparecerán solamente dos bandas de 550 y 650 pb correspondientes al control interno.

ANALISIS ESTADISTICO

Se utilizará únicamente análisis descriptivo: Porcentajes para variables nominales.

CONSIDERACIONES ETICAS.

Esta investigación se considera de acuerdo al artículo 17 del reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud pública, publicado en el diario oficial como riesgo mínimo.

El trabajo de investigación se llevó a cabo posterior a la aprobación del protocolo por un Comité Local de ética e Investigación del Hospital. El modelo metodológico de este estudio propone: conocer los beneficios que existen al manejar estas lesiones con manejo conservador y vigilancia a largo plazo y valorar la evolución por medio de la tipificación viral del virus del papiloma humano, causa etiológica del cáncer cérvico uterino.

Se realizó un consentimiento bajo información para ser firmado por la paciente al consentir ser parte del estudio.

AMBITO GEOGRAFICO

El presente estudio fue realizado en el hospital central norte de los servicios médicos de petróleos mexicanos, ubicado en la delegación Azcapotzalco con pacientes de derechohabientes de dicha institución, residentes de la misma delegación y áreas circunvecinas, también se incluyeron pacientes referidas del hospital general de tula hidalgo de los servicios médicos de Pemex quienes radican en esa ciudad.

RECURSOS PARA EL ESTUDIO

Recursos humanos

- Medico adscrito y Medico residente de la clínica de Displasias del servicio de Ginecología y obstetricia del Hospital Central Norte.
- Enfermera de la clínica de Displasias del servicio de Ginecología y obstetricia del Hospital Central Norte.
- Personal de Trabajo Social de Hospital Central Norte y Hospital General de Tula de Petróleos Mexicanos.
- Químico y personal técnico del Laboratorio de Biología Molecular de los servicios médicos de petróleos mexicanos.

Recursos materiales

- Guantes estériles
- Espéculos vaginales desechables
- Citobrush
- Tubos de ensayo
- Solución salina
- Laboratorio de biología molecular
- Material de papelería

Recursos financieros

- Los aporta el servicio médico de PEMEX

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Revisión Bibliográfica	Marzo 2008				
Elaboración Protocolo		Abril 2008			
Revisión comité de ética		Abril y Mayo 2008			
Recolección de Datos			Abril y Mayo 2008		
Análisis Estadístico				Junio 2008	
Resultados				Junio 2008	
Publicación					Agosto 2008

RESULTADOS

En la clínica de displasias del servicio de ginecología y obstetricia del hospital central norte de un total de 5629 pacientes en control se identificaron 64 pacientes con diagnóstico histopatológico de neoplasia intraepitelial grado III, 34 de las cuales fueron tratadas con manejo conservador mediante cono ASA electroquirúrgica o crioterapia, en las 30 pacientes restantes se practicó histerectomía por diversas causas ginecológicas siendo la miomatosis uterina la causa más frecuente.

De las 34 pacientes que cumplieron el criterio de NIC III y manejo conservador para entrar al estudio, en 12 pacientes no se concretó su participación por las siguientes causas: 1 paciente había fallecido, 1 paciente presentaba incapacidad física para realización de la prueba, 2 pacientes no eran derecho habientes al momento del estudio, 2 pacientes cambiaron de residencia fuera de la ciudad y 6 pacientes no fueron localizadas.

Un total de 22 pacientes ingresaron al estudio previa información y consentimiento firmado de información y participación voluntaria de las cuales 7 pacientes eran codificación 00 correspondiente a ser pacientes trabajadoras y 15 pacientes codificación 08 correspondiente a ser esposa de trabajador, 4 pacientes radicaban en la ciudad de Tula Hidalgo y 18 pacientes viven en el área metropolitana del Distrito Federal, 21 pacientes fueron tratadas mediante cono ASA electroquirúrgica y solo 1 paciente mediante crioterapia.

De las 22 pacientes a quien se les practicó la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa para detección de virus del papiloma humano 19 fueron negativas (86.36%) y 3 positivas (13.6%), siendo los serotipos detectados 16 (4.54%), 52 (4.54%) y 26 (4.54%).

De las pacientes que aun presentan positividad para DNA del VPH en 2 de ellas se practicó cono ASA electroquirúrgica y en la otra paciente crioterapia, las tres pacientes son residentes del área metropolitana del distrito federal y son

codificación 08. Los serotipos persistentes reportados 2 son considerados de alto riesgo oncogénico y uno de ellos el serotipo 26 frecuentemente presente en condilomas.

De las pacientes con PCR negativas en cuanto el tiempo de haberse realizado su manejo conservador se tiene registrado como el mas antiguo en 1998 y en la paciente que se realizo mas reciente fue en el 2006, sin tener mas casos detectados en los últimos dos años. En cuanto a las pacientes que fueron positivas aquella con serotipo 16 se había realizado el cono ASA electroquirúrgica en el 2005, la paciente con serotipo 52 se realizo su crioterapia en el 2007 y la paciente positiva con serotipo 26 se realizo el cono ASA electroquirúrgica en el 2003.

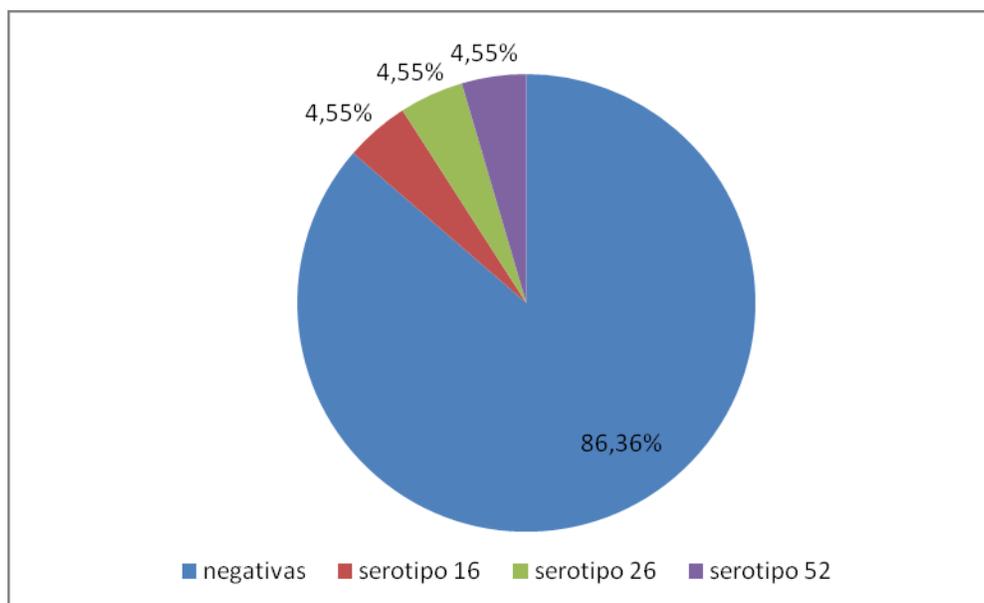


Tabla 1 Pacientes con NIC III post tratamiento conservador a quien se les practico PCR para VPH

DISCUSION

El virus del papiloma Humano considerado una infección de transmisión sexual de las mas frecuentes, se encuentra altamente relacionado con la neoplasia intraepitelial cervical de alto grado NIC III y cuya importancia radica en la asociación a cáncer cervicouterino motivo por el cual en muchas instituciones de salud pública y aún mas en centros hospitalarios privados es motivo de tratamientos radicales como lo es la histerectomía, sin embargo dicho tratamiento no esta justificado, el manejo de la neoplasia intraepitelial de bajo y alto grado sigue siendo el manejo conservador como el cono ASA electroquirúrgica o en casos seleccionados la crioterapia con controles estrictos subsecuentes de la pacientes, siempre y cuando no exista patología ginecológica agregada, es por eso que consideramos de importancia la realización de este estudio ayudándonos con uno de los métodos mas fidedignos para la detección del virus del papiloma humano como lo es la reacción en cadena de la polimerasa la cual nos detecta fragmentos de DNA del virus con su serotipo para verificar la curación de la lesión provocada por el VPH o su persistencia una vez tratada conservadoramente y revelando el serotipo viral el cual es un parámetro para la clasificación del virus como alto, mediano o bajo riesgo oncogénico dando un mejor parámetro clínico para el tratamiento y seguimiento de la paciente afectada. Cabe mencionar que la crioterapia solo la recomendamos en aquellas pacientes que aún no terminan su deseo reproductivo.

En nuestro estudio corroboramos que el tratamiento de elección en pacientes con displasia de alto grado como lo es el NIC III el manejo conservador es el de primera elección con una alta curación de la lesión (86.36%) evitando los riesgos de morbilidad quirúrgica de una cirugía mayor como lo es la histerectomía que no se justifica en estas pacientes si no presentan otra patología ginecológica agregada.

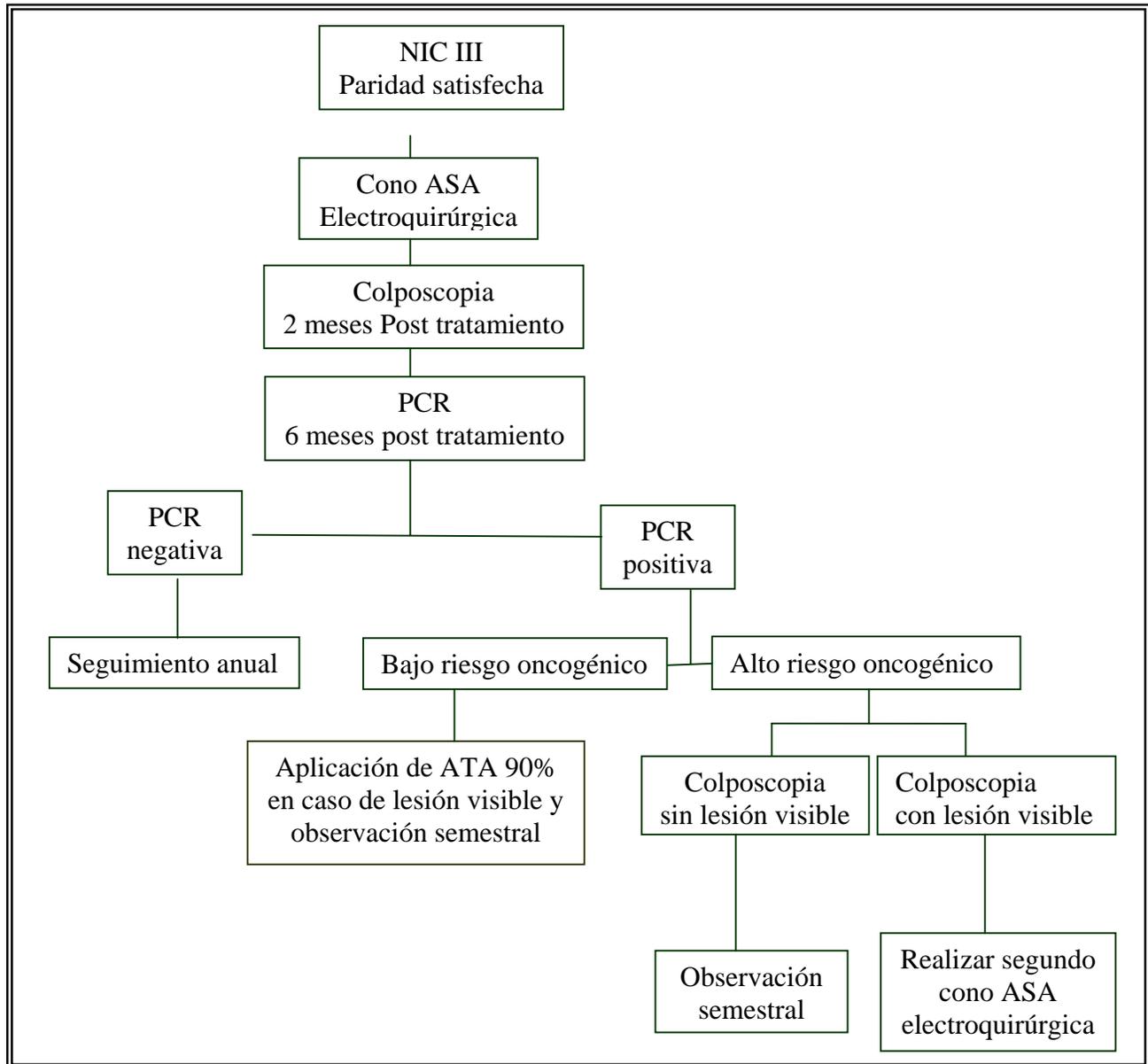
De las pacientes positivas que conforman el 13.6 % fueron positivas con serotipos de alto y mediano riesgo oncogénico una de ellas positiva al serotipo 16 y considerando la edad de la paciente 63 años se envió al servicio de ginecología para histerectomía, las otras dos pacientes positivas para serotipos 52 y 26 tomando en cuenta la edad y no tener patología agregada una de ellas de 28 años de edad (con serotipo 52) se mantendrá en observación y la otra paciente de 42 años de edad (con serotipo 26) se le practicara una segunda electrocirugía como ASA.

En nuestra población derechohabiente del hospital central norte la neoplasia intraepitelial grado III representa el 1.1% acorde a la literatura mundial que oscila entre el 0.05% al 1.5% y en algunos reportes hasta el 3 %.

Nuestro manejo en la clínica de displasias en pacientes con NIC III apegado a la norma oficial mexicana en una paciente con paridad satisfecha es: una vez hecho el diagnostico por colposcopia y toma de biopsia con estudio histopatológico se realizará manejo con cono ASA electroquirúrgica y revisión a los dos meses mediante colposcopia y a los 6 meses se realiza la toma de muestra para PCR, en caso de ser negativa se realiza seguimiento anual de la paciente, si es negativa por los dos años posteriores valorando los casos en particular se podría dar de alta a la paciente con papanicolaou anual, en caso de ser positiva la PCR si es un serotipo de bajo riesgo oncogénico se puede manejar solo mediante la aplicación de ácido tricloroacético al 90% y observación semestral, en caso de ser un serotipo viral de alto riesgo oncogénico y si en la colposcopia no hay lesión visible se maneja solo con observación semestral y en caso de haber lesión visible en la colposcopia la paciente se somete a una segunda electrocirugía como ASA.

En caso de ser pacientes jóvenes con deseo reproductivo aun no satisfecho nosotros optamos de primera instancia con manejo conservador

mediante crioterapia y el mismo seguimiento pos tratamiento que las pacientes manejadas mediante electrocirugía cono ASA.



Cuadro 1. Manejo y seguimiento de pacientes con NIC III, en la clínica de displasias del servicio de Ginecoobstetricia del HCN.

CONCLUSIONES

El virus del papiloma humano es una de las infecciones de transmisión sexual mas frecuentes a nivel mundial, su importancia radica en la asociación con el desarrollo del cáncer cervicouterino teniendo como antesala a la neoplasia intraepitelial grado II y III. Es de gran importancia la identificación del serotipo viral para distinguir en alto, mediano y bajo riesgo oncogénico teniendo con esto un mejor parámetro para la elección del tratamiento de la paciente su seguimiento y pronostico.

La colposcopia, el Papanicolaou, el estudio histopatológico de la lesión son estudios básicos, para el diagnóstico de la NIC y actualmente la identificación del serotipo viral mediante PCR, son los estudios sofisticados, que requieren alta tecnología, que nos sirven para el control y la curación de éstas pacientes.

El manejo conservador mediante cono ASA electro quirúrgica y la crioterapia es el tratamiento de elección en pacientes con neoplasia intraepitelial grado III o displasias de alto grado, en pacientes que no presenten otra patología ginecológica o que no hallan cumplido con su vida reproductiva, el tratamiento conservador presenta un importante índice de curación de la lesión.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) Carrillo A. Mohar A. Meneases A. Frias-Mendivil M. Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. Sal Púb de Méx.2004. (46).
- 2) Wright T, Massad LS, Dunton Ch. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. Am Jour Obs Gyn. 2007.
- 3) López MA. Tenorio R. Zepeda J. Estudio comparativo entre los diagnósticos citológico y colposcòpico en las neoplasias intraepiteliales cervicales grado III y carcinomas in situ diagnosticados por histopatología en el hospital central norte de petróleos mexicanos. Tesis de postgrado. 2003.
- 4) Marie CR. Joao SP. Prado CM. Villa LL. Cervical Coinfection with Human Papillomavirus (HPV) Types as a predictor of Acquisitions and persistence of HPV infection. Jour Inf Dis. 2001(17)184:1508.
- 5) Bosch X. Forlay J. Pisani P. Parkin DM.Epidemiology of human papillomavirus infections: New options for cervical cancer prevention. Sal Púb Mex 2003; 45 (3) S326-S339.
- 6) Lozano PE. Alonso MD. Ruiz MJ. Hernandez IS. Recommendations for cervical cancer screening programs in developing countries. The need for equity and technological development. Sal Pub Mex. 2003; 45(3):s449-s462.
- 7) Tamayo L., Valencia M., Escobar S.,Pérez L., Tendencia de la infección por el virus del papiloma Humano (VPH) en usuarias del servicio de citología del

laboratorio docente asistencial de la escuela de bacteriología y laboratorio clínico de la universidad de Antioquia. Rev Fac Far. 1993-1998. (42).

8) Consuegra MC, Molina CD, El virus del Papiloma Humano (HPV), agente vital importante precursor de la mayoría de las displasias o Cáncer Cervical. Salud uninorte Barranquilla 2004. (19) 3-13.

9) Gloria YF. Bierman R. Natural History of cervicovaginal Papillomavirus infection in young Women. *MASSACHUSETTS MEDICAL* .1998.338 (7) 423-428.

10) Hernández GC. Smith SJ. Arreola CE. Hernández AM. Prevalencia de infección por virus de papiloma humano VPH de alto riesgo y factores asociados en embarazadas derechohabientes del IMSS en el estado de Morelos. Sal Púb Mex 2005(47)423-429.

11) Alvarez F. V y col: Epidemiologic traits in women with sterility and cervical lesions withor without infection by human papiloma virus (VPH). Comparative study. Ginec. Obst. Mex. 1998; 66:157.

12) Álvarez FJ. Bustos LH. Villanueva DC. Zambrana CM. Características en mujeres con esterilidad y lesiones cervicales con y sin infección por virus del papiloma humano (VPH).Estudio comparativo. Ginec. Obst. Mex. 1998; 66:157

13) Torres Lobatón Alfonso. Cáncer Ginecológico diagnostico y tratamiento. Edit. Mc Graw Hill primera edición 2004, cap 15 pg 103.

14) Kumar V, Cotran R, Robbins S. Patología humana: Robbins. Edit. Mc Graw Hill, 17ª Ed. 2003.

15) Salas I, Villalobos E, Ramírez B. Prevalencia de Displasia y Cáncer cervicouterino y factores asociados en el hospital central de Chihuahua, México. CIMEL 2006 Vol. 11 N° 1

- 14) [Bartlett, Stirling. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. Methods Mol Biol. 226:3-6 \(2003\).](#)
- 15) Scott L. Butler, Mark S.T. Hansen, Frederic D. Bushman. [A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo](#). Nature Medicine (7): 631-634. doi:10.1038/87979 (2007).
- 16) Coleman, WB y Tsongalis, Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian. Humana Press. pgs. 47-56 y 65-74 (2006).
- 17) Lazcano PE, Herrero R. Epidemiology of HPV infection among mexican women with normal cervical cytology. Instituto de Salud Pública. 2000.
- 18) Sánchez AM. Uribe SF. Human papillomavirus infection is a possible biological marker of sexual behavior among university students. Sal Pub Mex 2002(44)442-447.
- 19) Marques FS. Gimenez GM. Percepción de un grupo de mujeres acerca del hecho de ser portadoras del VPH. Ginc Obstet mex. 2005; (73) 531-6
- 20) González SJ. Chávez BJ. Hernández HD. Martínez SS. Infección por virus del papiloma Humano de alto y bajo riesgo en mujeres con NIC. Características diferenciales. Gynec Obtet Ginecol 2002; 70:11.
- 21) Tirado GL. Mohar BA. López CM. García CA. Factores de riesgo de Cáncer Cervico uterino Invasor en mujeres mexicanas. Sal Pub de Mex. 2005,47(5)
- 22) Pérez Cruz E, Winkler JL. Detección y seguimiento con inspección visual del cérvix para la prevención del cáncer cervicouterino en las zonas rurales de México. Mex. 2005; 47: 39-48.

23) Gonzalez RF. La Cruz PC. Vacunas profilácticas frente al VPH. Documento de consenso de las sociedades científicas. 2007.

24) Alonso RP. Duperval PA.Lazcano PE. Ruiz Moreno JA. Infeccion de transmisión sexual por virus del papiloma humano en mujeres. 2005.