



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ

Detección y Prevalencia del Virus del Papiloma Humano en pacientes
embarazadas del Hospital General Dr. Manuel Gea González

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALIDAD EN
GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA

PRESENTA

Emma Elizabeth Marsal Martínez

TUTOR : Dr. Samuel Weingerz Mehl



MÉXICO, D.F.

JULIO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fué realizado en el Hospital General Dr. Manuel Gea González y en la Sección de Estudios de Postgrado e Investigación de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Samuel Weingerz Mehl.

Este trabajo de Tesis con No. DEDI/150/2009, presentado por la alumna Marsal Martínez Emma Elizabeth se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis Dr. Samuel Weingerz, y la Dirección de Enseñanza e Investigación a cargo del Dr. Octavio Sierra Martínez, con fecha 31 de Julio 2009 para su impresión final.

**Dr. Octavio Sierra Martínez
Dirección de Enseñanza e Investigación**

**Dr. Samuel Weingerz Mehl
Tutor principal**

Autorizaciones

Dr. Octavio Sierra Martínez
Director de Enseñanza e Investigación
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr. Gerardo Lara Figueroa
Jefe de la División de Ginecología y Obstetricia
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr. Samuel Weingerz Mehl
Jefe de la División de Bioética
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

**Detección y Prevalencia del Virus del Papiloma Humano en pacientes embarazadas del
Hospital General Dr. Manuel Gea González**

Colaboradores:

Dr. Gerardo Lara Figueroa. Jefe de la Subdirección de Ginecología y Obstetricia. Hospital General Dr. Manuel Gea González.

Dra. Marcela Lizano Soberón. Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer. Instituto Nacional de Cancerología-Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Adela Carrillo García. Maestra en Ciencias. Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer. Instituto Nacional de Cancerología-Instituto de Investigaciones Biomédicas.

AGRADECIMIENTOS

Como muestra de agradecimiento por su cariño y apoyo moral, deseo expresarles que mis ideales, esfuerzos y logros han sido también suyos, con amor, admiración y respeto para mamá y papá.

A mis arañitas Kevin, Jhona y Francis por recordarme día a día lo que es el amor puro y sincero.

A mi hermanas Montse y Cynthia, por ayudarme a poner las cosas en perspectiva, por los momentos juntas y por su apoyo incondicional.

A la Dra. Rita Valenzuela y al Dr. Lara Figueroa, por su ejemplo y apoyo.

A la Dra. Lizano, Adela, Adriana, Fer y Freddy gracias, por el apoyo y comentarios, así como la ayuda para esclarecer las dudas que surgieron en cada una de las etapas de mi proyecto que sin eso, todo esto no hubiera sido posible.

A mis profesores, por su esmero en mi formación profesional.

A mis amigos que hicieron esto más fácil y que cada día me enseñaron el sentido de la amistad Jackie, José Miguel, Jean y Mau.

Y por último, gracias a todos los demás que estuvieron conmigo en esta etapa de mi vida.

INDICE

Abreviaturas	IV
Relación de figuras	V
Relación de tablas	VI
Relación de gráficos	VII
Resumen	VIII
Abstract	IX
1. Introducción	1
2. Antecedentes	1
2.1. Presentaciones clínicas.....	1
2.2. Factores de riesgo para la infección	4
2.3. Vías de transmisión	5
2.4. Virología	5
2.5. Patogénesis	8
2.5.1. Genes y ciclos de vida del virus	8
2.5.2. Clasificación del virus del papiloma humano	11
2.6. Epidemiología	13
2.6.1. Riesgo de muerte en México	15
2.7. Diagnóstico y tratamiento.....	16
2.7.1. Diagnóstico.....	16
2.7.2. Tratamiento	18
2.7.2.1. Ensayos en vacunas	18
2.7.2.1.1 Gardasil	19
2.7.2.1.2. Cervarix	20
3. Justificación	20
4. Hipótesis	21
5. Objetivos	21
5.1. Objetivo General	21
5.2. Objetivos Particulares	22
6. Material y Métodos	22
6.1. Tipo de estudio	22
6.2. Ubicación temporal y espacial	22
6.3. Criterios de selección de la muestra	22
6.4. Variables	23
6.5. Tamaño de la muestra	23

6.6. Métodos de laboratorio	24
6.6.1.- Procesamiento de muestras	24
6.6.2.- Amplificación y secuenciación.....	24
6.6.3.- Amplificación del gen L1.....	26
6.6.4.- Amplificación de E6 y LCR.....	27
6.7. Análisis estadístico	27
6.8. Descripción operativa del estudio	27
7. Resultados	29
8. Análisis y Discusión	37
9. Conclusiones	39
10. Perspectivas	40
11. Bibliografía	41
12. Anexos	47
12.1. Anexo No. 1 Carta de Consentimiento Informado	47
12.2. Anexo No. 2 Encuesta para recabar datos personales y gineco-obstétricos de las pacientes al momento de la toma de muestra	49
12.3. Anexo No. 3 Talas de resultados analizados con el programa SPSS de estadística	50

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1. Historia natural de la infección por el virus del papiloma humano y su posible progresión a cáncer cervicouterino.

Figura 2. Esquema de la progresión al cáncer cervicouterino.

Figura 3. Microfotografía electrónica de un papilomavirus.

Figura 4. El ciclo viral en el epitelio estratificado.

Figura 5. Mapa del genoma del VPH 16.

Figura 6. Modelo general del ciclo de vida del VPH.

Figura 7. Esquema de clasificación de las enfermedades por el virus del papiloma humano, con la correspondiente progresión histopatológica.

Figura 8. Resumen de la relación entre la taxonomía y patología de algunos VP's.

Figura 9. Carga de la infección por el virus del papiloma humano; incidencia mundial anual estimada.

Figura 10. Estimados de incidencia y mortalidad del cáncer cervicouterino por región.

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1. Localización y secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR y la secuenciación.

Tabla 2. Condiciones específicas de magnesio y Tm para los oligonucleótidos utilizados.

Tabla 3. Condiciones de ciclado y temperatura para la reacción de secuenciación.

Tabla 4. Porcentajes de B-Globina en muestras.

Tabla 5. Porcentaje de muestras positivas para MY.

Tabla 6. Porcentaje de muestras positivas para LC.

Tabla 7. Porcentaje de muestras positivas para VPH según tipificación.

Tabla 8. Pacientes estudiadas de acuerdo a edad.

Tabla 9. Riesgo para infección por VPH asociado a consumo de tabaco.

Tabla 10. Riesgo para infección por VPH asociado a IVSA.

Tabla 11. Riesgo para infección por VPH asociado al número de parejas sexuales..

Tabla 12. Riesgo para infección por VPH asociado al uso del preservativo.

Tabla 13. Prevalencia de VPH asociado al trimestre de embarazo.

RELACIÓN DE GRÁFICOS.

Gráfico 1. Porcentaje de muestras positivas para MY.

Gráfico 2. Porcentaje de muestras positivas para LC.

Gráfico 3. Porcentaje de muestras positivas a VPH según tipificación.

Gráfico 4. Pacientes estudiadas de acuerdo a edad.

Gráfico 5. Riesgo para infección de VPH asociado al consumo de tabaco.

Gráfico 6. Riesgo para infección por VPH asociado a IVSA.

Gráfico 7. Riesgo para infección por VPH asociado al número de parejas sexuales.

Gráfico 8. Riesgo para infección por VPH asociado al uso del preservativo.

Gráfico 9. Prevalencia de VPH asociado al trimestre de embarazo.

RESUMEN

Las estimaciones epidemiológicas sugieren que la prevalencia mundial de la infección por VPH es del 9% al 13%, o aproximadamente 630 millones de personas(1), estimaciones obtenidas a partir de estudios de citologías cervicales que muestran la prevalencia del ADN del VPH determinado por reacción de polimerasa en cadena o de captura de híbridos en las mujeres de los ensayos seleccionadas en varias zonas geográficas (13,3% en Ontario, Canadá; 14,5% en el Estado de Morelos, México; 16,6% en Concordia, Argentina, 15,3% en Reims, Francia, el 41,6% en Harare, Zimbawue, y 18% en la provincia de Shanxi,China (2-7).

Mundialmente, el cáncer de cuello uterino es el segundo, con el cáncer de mama como la principal causa de cáncer en las mujeres (13), con una prevalencia global de 2,3 millones de mujeres (12). Representa casi el 10% de todos los cánceres (con exclusión del melanoma) (14). Las zonas de mayor riesgo para el cáncer cervical se encuentran en África meridional y oriental, Malasia, el Caribe, y America Central.(14).

Se analizaron 100 muestras de pacientes embarazadas que consistieron en toma de células exfoliadas de cervix. Para determinar la presencia del virus se extrajo el ADN de las muestras y se les realizó un PCR anidada con dos juegos de oligonucleótidos que amplifican la región L1 del ADN viral. Posteriormente, y para determinar los tipos presentes en ésta población, se secuenciaron los fragmentos obtenidos y se compararon en BLAST. Con una prevalencia del 38% positivo en PCR para VPH en las muestras de pacientes embarazadas. Se encontraron 16 tipos diferentes de VPH en las muestras analizadas, siendo el VPH tipo 35 el más frecuente con el 16.67% (7/42), en segundo lugar el tipo 68 con el 14.2% (6/42) y en tercer lugar de frecuencia el VPH 16 con 11.9% (5/42). Se observó que el 73.8 % de los tipos virales encontrados fueron de VPH de alto riesgo, 4.7% de VPH de probable alto riesgo, 14.2 % de bajo riesgo y un 7.1 % de VPH sin clasificar.

Además se evaluó la relación entre VPH y los factores de riesgo más importantes para la infección de VPH y el desarrollo de cáncer cervicouterino, encontrando como único factor de riesgo para adquirir la infección del VPH, tener más de una pareja sexual.

Se necesitan hacer otros estudios que permitan evaluar el efecto del VPH que pudiera tener en la mucosa cervical en el puerperio mediato y tardío, donde el estado de inmunosupresión causado por el embarazo podría influir de manera directa sobre la historia natural de la infección por el virus del papiloma humano.

Abstract

The estimations epidemiologists suggest it world-wide prevalence of the infection by VPH is from 9% to 13%, or approximately 630 million people (1), estimations obtained from studies of cervical cytology that show the prevalence of the DNA of the VPH determined by reaction of polymerase in chain or capture of hybrids in the women of the tests selected in several geographic zones (13.3% in Ontario, Canada; 14.5% in the State of Morelos, Mexico; 16.6% in Concord, Argentina, 15.3% in Reims, France, 41.6% in Harare, Zimbabwe, and 18% in the province of Shanxi, China (2-7). Worldwide, the cancer of uterine neck is the second, with the cancer of breast like the main cause of cancer in the women (13), with a global prevalence of 2.3 million women (12). It almost represents 10% of all the cancers (excluding the melanoma) (14). The zones of greater risk for the cervical cancer are in southern and Eastern, Malaysia, Africa, the Caribbean, and Central America. (14). 100 samples of pregnant patients were analyzed who consisted of exfoliated cells of cervix. In order to determine the presence of the virus the DNA of the samples was extracted and a PCR nested with two oligonucleótidos games was producer to them of that amplify the L1 region of the viral DNA. Later, and to determine the present types in this one population, the obtained fragments were sequence and they were compared in BLAST. With a prevalence of the 38% positive in PCR for VPH in the samples of pregnant patients. Were 16 types different from VPH in the analyzed samples, being the VPH the most frequent type 35 with the 16.67% (7/42), secondly type 68 with 14.2% (6/42) and thirdly of frequency VPH 16 with 11.9% (5/42).

It was observed that 73.8% of the found viral types were of VPH of high risk, 4.7% of VPH of probable stop risk, 14.2% of low risk and 7.1% of VPH without classifying. In addition one evaluated the relation between VPH and the more important factors of risk for the infection of VPH and the development of cervix cancer, finding like factor of greater risk for the infection of the VPH , to have more than a sexual pair.

They are needed to make other studies that allow to evaluate the effect of the VPH that could have in the cervical mucosa in the mediate and delayed childbed, where the state of immunity depress caused by the pregnancy could influence of direct way the natural history of the infection by the virus of the human papilloma.

1. INTRODUCCION

El virus del papiloma humano (VPH) está involucrado en la mayoría de las enfermedades pre malignas y malignas del cérvix, es la infección más común transmitida sexualmente que afecta a millones de mujeres en todo el mundo (1). Los centros para el control y prevención de enfermedades ha informado que el riesgo de adquirir la infección por VPH, las mujeres sexualmente activas y los hombres es al menos del 50% (2). La prevalencia de VPH en el tracto genital es comparable entre las mujeres embarazadas que en las no embarazadas, con un porcentaje del 20 al 30%. El pico de incidencia de la infección ocurre después del inicio de la vida sexual y globalmente en la tercera década de la vida, tiempo que el potencial de reproducción de la mujer es máximo.(3)

Esta infección es un hallazgo probable en la mujer embarazada, estudios recientes han reportado la detección de virus de VPH de alto riesgo por medio de DNA en el 37.2% de las mujeres embarazadas y en el 14.2% de las mujeres no embarazadas (4). Los tipos oncogénicos de VPH 16 y 18 son los más comunes aún en el embarazo (3). Los tipos de VPH no oncogénicos causan lesiones visibles (condilomas) en el tracto genital que pueden tener una rápida proliferación durante el embarazo en respuesta a los cambios hormonales, conduciendo a síntomas locales y en raras ocasiones causan papilomatosis laríngea en los infantes.

Un concepto común es que el estado de inmunosupresión en el embarazo que causa una infección más agresiva por VPH, sin embargo a la fecha no se ha mostrado evidencia que sugiera una historia natural diferente de la infección por VPH en el estado del embarazo.

Tampoco hay evidencia de que los efectos del embarazo modifiquen el porcentaje de infectividad, prevalencia o persistencia de las infecciones por VPH (3).

2. ANTECEDENTES

2.1.- PRESENTACIONES CLÍNICAS

Las infecciones por el VPH se encuentran entre las más comunes infecciones de transmisión sexual (1). Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades ha informado que el riesgo de adquirir la infección por VPH, los hombres sexualmente activos y las mujeres es al menos del 50% (2). La infección por VPH puede causar displasia epitelial y cáncer, principalmente en el cuello uterino, y tumores benignos de los órganos genitales, la región perianal, y la laringe (5).

El período de incubación de la infección a partir del tiempo al desarrollo de las manifestaciones de VPH parece ser muy variable, desde semanas hasta años, aunque hay muchas personas infectadas con el VPH no relacionadas con el desarrollo de lesiones (5). La duración de la infección por VPH es más duradera de VPH de alto riesgo (por ejemplo, el VPH 16 y 18) que para los de bajo riesgo (por ejemplo, el VPH 6 y 11) (6).

En la figura 1, se muestra la secuencia general de evolución de las enfermedades causadas por el virus del papiloma humano (7,8). Cabe destacar que la mayoría de las infecciones por el VPH y displasias de bajo grado desaparecen del organismo sin tratamiento y pueden no ser predictivas de enfermedades más graves. (9,10).

Figura 1. **Historia natural de la infección por el virus del papiloma humano y su posible progresión a cáncer cervicouterino.**



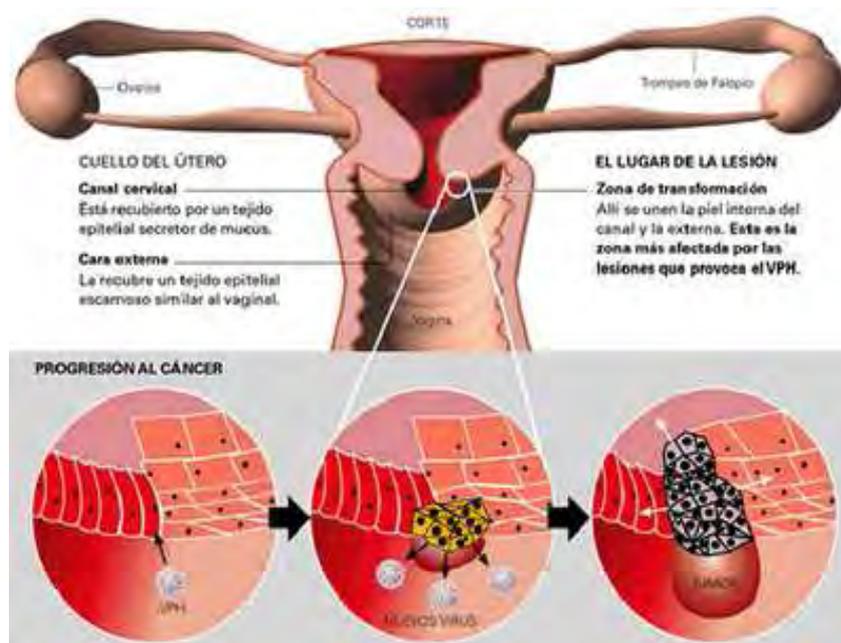
Adaptado de Schiffman M, y cols, Pinto AP, y cols.

Una infección persistente con VPH de alto riesgo, es una condición necesaria para el desarrollo de la neoplasia intraepitelial cervical (CIN) y de cáncer de cuello de útero (9, 11)

Entre las manifestaciones más comunes son las infecciones de VPH de bajo grado, displasias del cuello uterino, estas lesiones se suelen resolver espontáneamente (2).

La infección por VPH también conduce a displasias de moderado y alto grado del cuello uterino (NIC 2 / 3), que son inmediatas y obligan a los precursores de cáncer de células escamosas del cuello uterino, y adenocarcinoma in situ, que es el precursor inmediato y obliga a un adenocarcinoma de cuello uterino. Dependiendo del grado histológico de la lesión (NIC), pueden presentar un retroceso, persistir, o progresar. Cuanto mayor sea el grado de lesión, es más probable que la lesión progrese (5) Fig. 2. Las lesiones cervicales de alto grado son tratadas por escisión. Si bien la cirugía suele ser curativa, puede limitar la fertilidad (13), aún en las mujeres que se someten a cirugía sigue existiendo el riesgo de NIC recurrente así como cáncer en vulva y vagina (14).

Figura 2. Esquema de la progresión al cáncer cervicouterino.



El VPH se ha estudiado más ampliamente en el contexto del cáncer de cuello uterino, pero se asocia con varios otros tipos de neoplasias malignas también. El VPH de alto riesgo se asocia con aproximadamente el 50% de cáncer en vagina, vulva, pene; 85% de los carcinomas anal, y el 10% de los cánceres de la laringe y del tracto aerodigestivo (15).

Las verrugas anogenitales (condiloma acuminata) son otra consecuencia de las infecciones

por el VPH, la mayoría de los casos asociados con el VPH tipos 6 y 11(16) Los estudios han demostrado que las verrugas anogenitales externas muestran regresión espontánea sin tratamiento hasta en el 40% de los pacientes (16).

Las verrugas genitales suelen presentarse como lesiones exofíticas, color carne en los genitales externos, incluido el pene, escroto y vulva; así como la región púbica, perineal, perianal y región crural (16, 17) las verrugas internas pueden afectar las membranas mucosas de la vagina, la uretra, el ano y la boca. Tanto las verrugas externas como internas pueden multiplicarse en coliflor, como agrupaciones. Las verrugas internas pueden causar malestar como dolor o sangrado (17), el diagnóstico de verrugas anogenitales tiende a crear preocupación y ansiedad en los pacientes y puede generar cambios de estilo de vida con respecto a las relaciones sexuales. Además, el tratamiento puede ser doloroso y embarazoso (18).

Una rara manifestación de la infección por VPH es la papilomatosis respiratoria recurrente (PRR), que se produce principalmente en la laringe y causa ronquera, asfixia, e infecciones recurrentes. PRR se asocia con VPH de bajo riesgo presentándose principalmente en niños. Puede ser una amenaza para la vida si los papilomas son lo suficientemente grandes como para obstruir las vías respiratorias. Los pacientes afectados deben someterse a frecuentes excisiones con láser (19).

2.2.- FACTORES DE RIESGO PARA LA INFECCIÓN

El riesgo de contraer un VPH genital está influenciado por la actividad sexual, por lo que el CaCu sigue un patrón típico de enfermedades transmitidas sexualmente.

- 1) Promiscuidad. Hay una fuerte asociación entre el número de parejas que han tenido tanto la mujer como su compañero a lo largo de su vida y la adquisición del VPH (20)
- 2) Actividad sexual a temprana edad.
- 3) Tener historial de otras enfermedades transmitidas sexualmente.
- 4) Verrugas genitales, test de papanicolaou con resultados normales.
- 5) Pareja sexual con cáncer de cérvix o de pene.
- 6) Edad. La infección es más común en mujeres jóvenes sexualmente activas, de 18 a 30 años de edad, después de los 30 años decrece la prevalencia. El CaCu es más común después de los 35 años, lo que sugiere infección a temprana edad y progresión lenta a cáncer. (21,22).
- 7) Persistencia viral. Común entre los tipos virales de alto riesgo y factor determinante en el desarrollo a cáncer. La persistencia puede inducir cambios genéticos secundarios dado que

las proteínas virales interfieren con los puntos de control del ciclo celular e inducen inmortalización de los queratinocitos.

8) Uso prolongado de anticonceptivos orales. La región larga de control, LCR por las siglas en inglés, en el genoma viral, contiene elementos de respuesta a glucocorticoides, inducidas por hormonas esteroidales como la progesterona (componente activo de los anticonceptivos orales) y la dexametasona. Estudios han reportado el uso de anticonceptivos orales y la alta positividad al DNA viral (23).

9) Coinfección con otros tipos de virus, como el del herpes simple (HSV) tipo 2, citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano tipos 6 y 7 (HHV-6), detectados todos en el cérvix.

10) Carga viral. Correlacionada directamente con la severidad de la enfermedad. El VPH 16 puede alcanzar una carga viral más alta que otros tipos virales.

11) Predisposición genética. Representa el 27% del efecto de los factores subyacentes para el desarrollo del tumor. La herencia afecta la susceptibilidad a la infección por VPH, la capacidad para resolverla y el tiempo de desarrollo de la enfermedad (24).

2.3.- VIAS DE TRANSMISIÓN

El virus del papiloma humano se transmite principalmente por contacto de piel a piel (25, 26). Dicho contacto implica ante todo el coito vaginal, pero también incluye la penetración o no entre genitales, el contacto de mano a genitales y el contacto bucogenital. (26,27,28). El uso de una barrera protectora, como (por ej. los labios mayores, el escroto o el ano) que quedan al descubierto. (25). Ya que la mayoría de las personas infectadas por el virus del papiloma humano son asintomáticas, pueden transmitir el virus inadvertidamente a sus compañeros sexuales. (26)

También se conocen vías no sexuales de transmisión del VPH. Las mujeres pueden transmitir el virus del papiloma humano a sus hijos durante el parto vaginal (26,27). Es posible la transmisión por exposición prolongada a vectores ambientales (como la ropa contaminada), o fomites, porque el virus es sumamente resistente a la desecación y al calor. (25,29)

No se ha estudiado bien la transmisión de la infección por VPH a los varones y el efecto patológico en general que causa en ellos.(30) Se sabe que los hombres actúan como vectores de la infección por el virus del papiloma humano, pero ha sido imposible una evaluación clínica más amplia por la carencia de medios fiables para obtener muestras de los genitales masculinos. (30)

2.4.- VIROLOGÍA.

En los últimos 20 años, se realizaron varias líneas de pruebas convergentes para identificar el VPH como una causa de cáncer cervical. El hallazgo de los genomas de VPH en los carcinomas de cuello uterino es un importante descubrimiento en el decenio de 1970. VPH

fue clonado, y su familia se define como grande y estrechamente relacionada (31).

Figura 3. **Microfotografía electrónica** de un papilomavirus

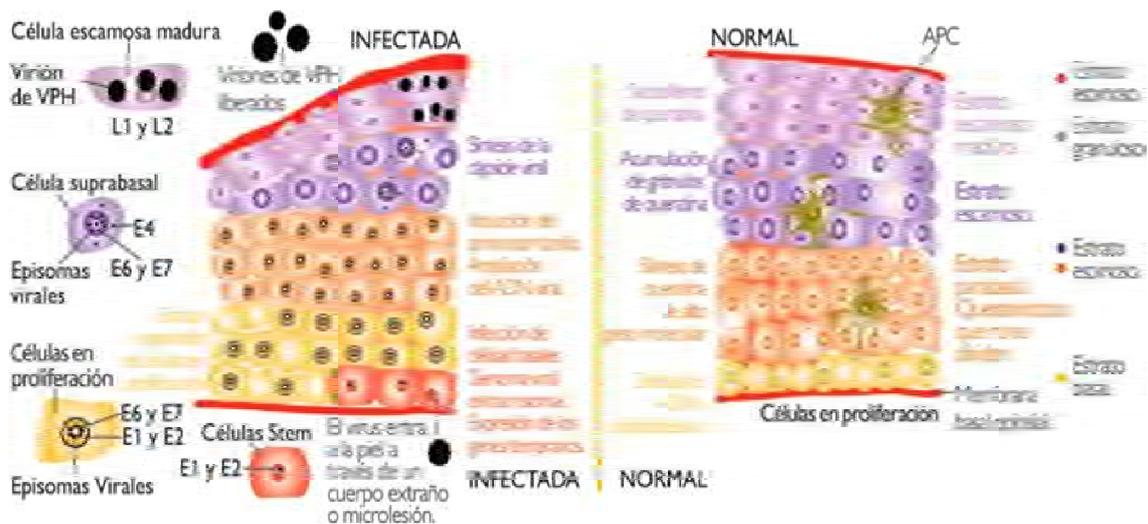


Actualmente, existen más de 100 tipos conocidos de HPV(32), aproximadamente de 30 a 40 tipos afectarán la zona anogenital, de 15 a 20 se clasifican como oncogénicos (32,33), agrupados a través de análisis clínicos y estudios epidemiológicos han demostrado que el VPH se encontró en 90% al 100% del cáncer de cuello uterino (34). En un meta-análisis, los tipos de VPH 16 y 18 se consideraron oncogénicos y representaron más del 70% de todos los cánceres cervicales (35).

Los virus del papiloma humano (VPH) son pequeños y desnudos, su cápside es de forma icosaédrica compuesta por 72 capsómeros. Su genoma está constituido por ADN circular de doble cadena, de aproximadamente 8,000 pares de bases. Solamente una de las cadenas de ADN codifica para los marcos de lectura abiertos (ORFs) y consiste en una región temprana que codifica para seis genes (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y una región tardía que codifica para dos genes (L1 y L2). Además posee una región larga de control (LCR), la cual no codifica para proteínas y tiene numerosos sitios de acción para activadores y receptores de la transcripción y posee el origen de la replicación viral.

Estos virus infectan células epiteliales, ya sea de la piel o de las mucosas (Zur Hausen, 2000). La infección inicial requiere que las partículas virales tengan acceso a las células en la capa basal, en el cuello uterino esto ocurre a través de pequeñas abrasiones en el tejido o durante la metaplasia escamosa en la zona de transformación cuando las células basales están expuestas (Doorbar, 2005). El ciclo de vida del virus está estrechamente relacionado con el programa de diferenciación de las células del epitelio escamoso estratificado, con la producción de viriones restringida a las células suprabasales diferenciadas (Doorbar, 2005).

Figura 4. **El ciclo viral en el epitelio estratificado**



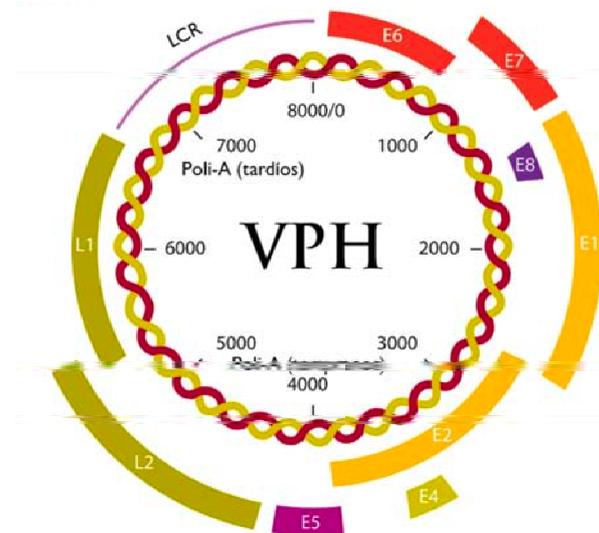
Fuente : Ian H. Frazer (2004). Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. Nature Reviews Immunology 4. 46-55.

Fig. 4. Arquitectura de la célula epitelial estratificada del cérvix y expresión de las proteínas virales después de la infección. Las células germinales normales se dividen a lo largo de la membrana basal y maduran verticalmente a través del epitelio sin división posterior (derecha). Después de que el VPH infecta estas células en la membrana basal (izquierda), se expresan las proteínas tempranas. Bajo la influencia de estas proteínas, las células que están en división se expanden verticalmente y la diferenciación celular es retrasada e incompleta. Las proteínas virales se expresan secuencialmente con la diferenciación y los viriones se producen en las capas superiores del epitelio. Las células presentadoras de antígenos intraepiteliales (APC) son abatidas en una célula infectada por VPH.

El ADN del genoma del VPH se divide en una región (E), y en una larga región (L). Las primeras proteínas E1 y E2 son los principales actores en el control de la replicación y transcripción. La proteína E6 se asocia con el tumor supresor p53 y la proteína promueve la destrucción proteolítica. Esto conduce a la transformación maligna y la pérdida de crecimiento de las células. La proteína E7 se asocia con la proteína retinoblastoma (pRb), que inactiva el ciclo celular de restricción de la función de esta proteína (36), el código de L1 y L2 son para el mayor y menor de las proteínas de la cápside del virión, respectivamente (37). Las proteínas de la cápside son los antígenos que sólo son accesibles ante una clásica respuesta de anticuerpos neutralizantes a HPV(38).

Figura 5. Mapa del genoma del VPH 16.

Posee una región con genes



tempranos:

E1, E2, E4, E5, E6 y E7;

una región con genes tardíos: L1 y L2;

y una región larga de control (LCR).

El VPH ha desarrollado una singular estrategia para evadir el sistema inmunitario innato acogida por replicar principalmente en queratinocitos diferenciados, que están destinados a morir y a mantener el antígeno de la cápside L1 y L2 lejos del antígeno de presentación (células de Langerhans y macrófagos). (38)

Si el sistema inmune no reconoce o borra una infección por VPH, una infección persistente puede establecerse en el intra epitelio, aumentando la probabilidad de progresión a cáncer. (38)

Una estrategia para prevenir la infección por VPH y enfermedades relacionadas con él, es crear una vacuna que prepara al sistema inmunológico a reconocer cápside viral de proteínas y la creación de anticuerpos neutralizantes que impiden la infección primaria con VPH.(38)

2. 5.- PATOGÉNESIS

Aunque la mayoría de las infecciones por el VPH anogenitales son transitorias y se resuelven espontáneamente, pueden resultar en cambios morfológicos que van desde verrugas benignas y otras lesiones de bajo grado a cáncer invasivo del cuello uterino, vagina, vulva y/o ano.

2.5.1.- Genes y ciclo de vida del virus

En el epitelio escamoso estratificado normal de las células basales completan su ciclo celular y se detienen en la fase G0 después de migrar a la capa suprabasal y llevan a cabo un proceso de diferenciación terminal. En las células infectadas por VPH, que expresan E7 y E6, se impide que se detenga el ciclo celular después de la mitosis y que las células tengan una diferenciación normal.

Los promotores temprano y tardío regulan la expresión de los genes de VPH durante las fases del ciclo de vida del virus. Además, la expresión de algunos de los genes tempranos está regulada, en parte, por mecanismo de splicing alternativo. Los factores de transcripción que regulan al promotor temprano se unen a sitios localizados en la LCR. La transcripción de los genes virales tardíos se activa en el epitelio en diferenciación a partir de los sitios localizados en el ORF del E7.

Las proteínas codificadas por los genes E1 y E2 están entre las primeras en ser expresadas durante el ciclo de vida del virus y actúan como factores de replicación. E1 tiene actividad de helicasa que ayuda a separar las hebras de ADN para su replicación.

La proteína E2, además de tener funciones en el reconocimiento del origen de replicación, ayuda a regular la transcripción del virus, ya que tiene la habilidad para activar o reprimir la expresión de genes, lo cual contribuye a controlar el número de copias virales en las células sin diferenciar. Las proteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo actúan como oncoproteínas, debido a que tienen actividades que estimulan la progresión celular ya que se unen a reguladores del ciclo celular. E7 se une a la familia de proteínas de pRB que tienen una función como reguladores negativos de la entrada de la célula a la fase S. La proteína E7 se une a Rb y lo secuestra, previniendo que se una a E2F y lo inactive. E2F es un factor de transcripción necesario para la expresión de las proteínas necesarias para la síntesis de ADN; al estar activado la célula entra en fase S y se pierde la regulación del ciclo celular. E7 además se une a otras proteínas del ciclo celular como desacetilasas de histonas, AP-1 y a los inhibidores de cinasas dependientes de ciclina p21 y p27. La proteína E6 complementa la actividad de E7 y funciona para prevenir la inducción de apoptosis en respuesta a la inducción de la fase S por parte de E7. E6 se une a la proteína supresora de tumor p53 y la marca para su degradación, además E6 también se puede asociar a otras proteínas pro-apoptóticas incluyendo Bak y Bax. Esto predispone a la célula a la acumulación de mutaciones que da como resultado la transformación. De esta manera E6 y E7 provocan inestabilidad genómica, permiten la replicación del virus, la inmortalización de las células y su transformación (Doorbar, 2005).

E4 es sintetizada principalmente en las fases tardías del ciclo de vida del virus, en los virus de alto riesgo puede estar involucrada en la regulación de la expresión génica ya que interactúa con una helicasa de ARN. El gen E5 se expresa durante las infecciones productivas, pero se ha observado que en CaCu se pierde durante la integración del genoma viral al genoma de la célula. Se ha sugerido que E5 se une al receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF), pero su función no ha sido establecida de manera clara (Doorbar, 2005).

Las proteínas estructurales se expresan en las capas superiores del epitelio, una vez que se ha completado la síntesis de ADN viral. L2 es la proteína menor de la cápside, la proteína mayor (L1) se expresa después de L2 permitiendo el ensamblaje de las partículas virales. La cápside está formada por 360 copias de L1 y por 12 copias de L2 organizadas en 72 capsómeros (Doorbar, 2005).

El ciclo de vida del VPH se diferencia de otros ciclos de vida de virus en que, la infección

requiere del potencial en la proliferación de células basales (39). El ciclo de vida comienza con la infección por VPH de las células basales del epitelio, probablemente como resultado de desgarros microscópicos en la piel o la mucosa (40).

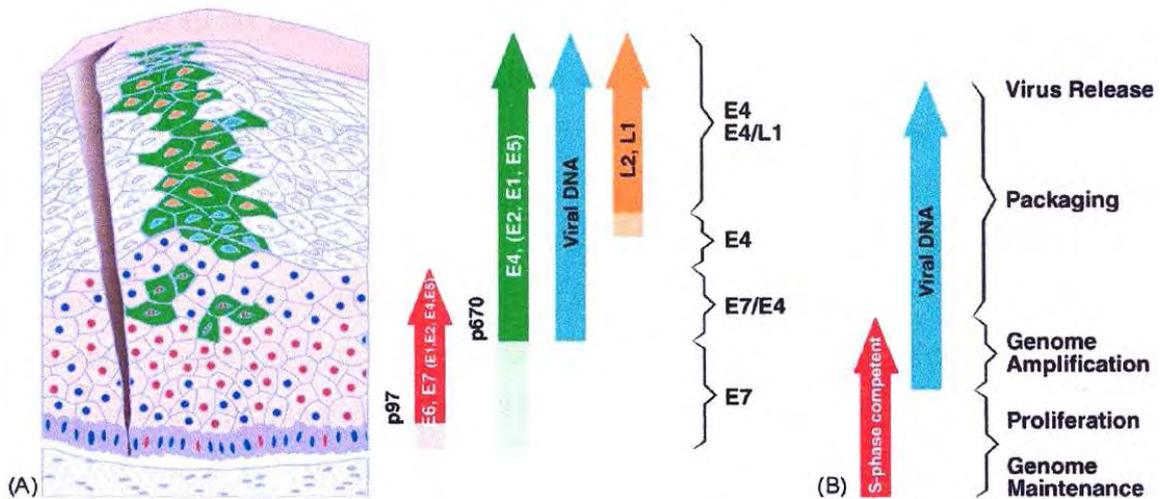


Figura 6. **Modelo general del ciclo de vida del VPH.** El ciclo de vida del VPH está estrechamente relacionado con la diferenciación del epitelio escamoso estratificado. (Doorbar, 2005)

En las células basales, la expresión de los genes del VPH es en gran parte suprimida, con la excepción de la expresión de la primera (E) los genes virales, lo cual aumenta la proliferación de células epiteliales (39) infectadas por el VPH de amplificación del genoma viral, que requiere la expresión de todos los principios de genes virales. (41)

Tras la entrada en las capas de células suprabasal, los genes virales son expresados (39), el VPH (40) codifica las proteínas estructurales, L1 y L2, que se expresan de amplificación del genoma viral, una vez se haya completado. La expresión de las proteínas permite un ensamblaje de viriones en las capas superiores del epitelio. (41)

El esparcimiento de queratinocitos muertos (parte del proceso natural del ciclo celular) y las emisiones de viriones de VPH infectan a otras células o transmiten el virus a otro individuo.(42)

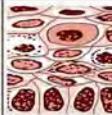
En lesiones benignas en piel asociadas a VPH, el virus mantiene su genoma como episomas a bajo número de copias (10-200 copias / célula) en las células basales del epitelio separada de la célula huésped ADN. Para mantener su ADN viral en un episoma, las proteínas virales E1 y E2 son expresadas. (41)

La expresión de proteínas virales E6 y E7 por la célula huésped infectada es para restablecer la progresión del ciclo celular y retardar una diferenciación terminal,

umentando así la frecuencia en la replicación de las células basales (41). El retraso de la detención del ciclo celular permite seguir en la replicación del VPH en las células del epitelio suprabasal. Esto puede producir el engrosamiento de la piel, una verruga, o de otras anomalías cervicales benignas detectadas en la prueba del Papanicolaou. (43)

Las neoplasias intracervicales (NIC) se clasifican sobre la base de la magnitud de la proliferación anormal de la capa basal del epitelio cervical. En displasia leve (NIC 1), la proliferación se produce hasta el tercio inferior del epitelio. NIC 1 incluye la displasia leve y condiloma (verrugas anogenitales). En displasia moderada (NIC 2), la proliferación se produce hasta la parte superior de dos tercios, y en la displasia severa (NIC 3), el epitelio es anormal. (44)

Figura 7. Esquema de clasificación de las enfermedades por el virus del papiloma humano, con la correspondiente progresión histopatológica

Equivalencia citológica	Clasificación de Bethesda	Normal	Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado		Lesión escamosa intraepitelial de alto grado		Cáncer invasor
	Grados según Papanicolaou	I	II	III		IV	V
NIC 1 (Richart)	Normal	Normal	Condiloma plano	NIC 1	NIC 2	NIC 3	Cáncer invasor
Displasia (Reagan)	Normal	Normal	Condiloma plano	Displasia leve	Displasia moderada	Displasia grave	CIS ^b
Histología del epitelio epidermoide (escamoso) del cuello uterino							

^bCIS = carcinoma *in situ*.

Bonnez W.

Además, en lesiones de bajo grado, hay queratinocitos grandes, conocidos como coilocitos, que se encuentran en las capas superiores del epitelio. Estas células sirven como un típico marcador para la infección del VPH. (44)

La infección por el VPH de alto riesgo resulta en ocasiones, en la integración del ADN vírico en el genoma huésped, y se considera un paso importante en la progresión tumoral.

Si la integración interrumpe el gen viral E2, E6 y E7, resulta en una sobre expresión, causando a las células infectadas por el VPH un ciclo largo de vida, conservando la capacidad de proliferar, desarrollar y perpetuar las mutaciones en el ADN germinal. Estas son las marcas en las células de la displasia del epitelio cervical. (40)

2.5.2. Clasificación del Virus del Papiloma Humano

Se han identificado más de 100 tipos diferentes de VPH basándose en las variaciones de su secuencia de ADN, los cuales difieren por más de un 10% de su secuencia. Una tercera parte de estos virus infectan mucosas. Existen algunos tipos de VPH que están relacionados más frecuentemente con el desarrollo de cáncer, a éstos se les ha clasificado como de alto

riesgo (VPH 16 y 18, entre otros) y los involucrados en el desarrollo de lesiones benignas se conocen como de bajo riesgo (VPH 6 y 11, entre otros).

Clasificación epidemiológica de los tipos de papilomavirus humanos asociados a cáncer de cérvix (Muñoz y col., N Engl J Med 2003;348:518-27)

- Tipos considerados de alto riesgo carcinogénico: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82.
- Tipos de probable alto riesgo: 26, 53 y 66.
- Tipos considerados de bajo riesgo carcinogénico: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108.
- Tipos de riesgo indeterminado: 34, 57 y 83
- Tipos sin clasificar: 1, 2, 7, 13, 27, 30, 32, 55, 62, 64, 67, 69, 71, 74, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91.

Los VP se clasifican en 3 niveles taxonómicos : Género, Especie y Tipo (45). Los diferentes géneros comparten menos del 60% de la identidad en la secuencia de L1; las especies de un género comparten una identidad de secuencia de 60 a 70% y los tipos virales dentro de una especie comparten de 71 a 89% de identidad de secuencia. Los VP conocidos que infectan tanto a humanos como a animales forman 16 géneros que se identifican por letras griegas. Cinco de estos géneros se componen exclusivamente de VPH's y VP's identificados en algunos primates, todos los géneros contienen tipos encontrados en varios mamíferos y aves.

El género clínicamente más importante es el referido como los virus del papiloma-Alfa o VP-Alfa (en inglés Alpha-papillomavirus). Contiene a todos los tipos de VPH asociados a lesiones en mucosas o genitales. Los VP-Beta incluyen todos los tipos de VPH asociados con epidermodisplasia verruciformis (EV), una enfermedad neoplásica cutánea con componente genético. En aquellos portadores que no son genéticamente predispuestos a la enfermedad, los VP-Beta y los VP-Gama establecen infecciones asintomáticas, o en el peor de los casos producen pequeñas lesiones cutáneas neoplásicas. Algunos de los virus de estos géneros también se han hallado asociados a cáncer de piel en individuos inmunosuprimidos.

Figura 8. Resumen de la relación entre la taxonomía y la patología de algunos VP's

LOS TIPOS VIRALES DE PAPILOMA MÁS ESTUDIADOS Y SUS PROPIEDADES CLÍNICAS

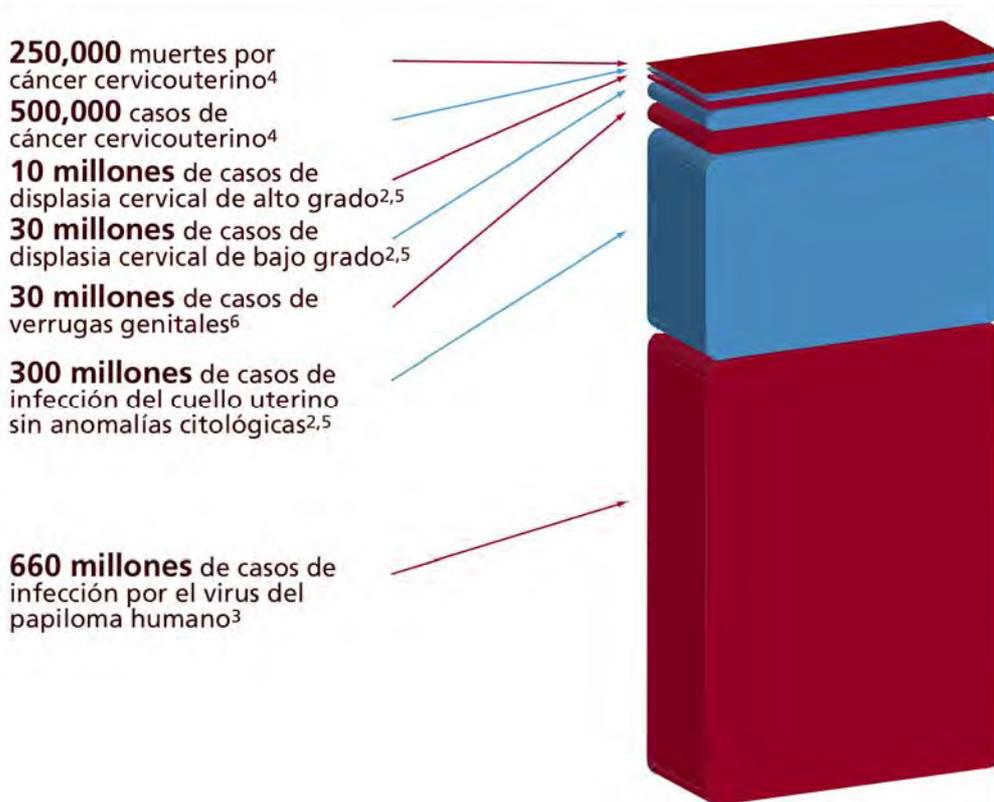
FAMILIA: PAPILOMAVIRIDAE			
GÉNERO	ESPECIE	TIPO (S)	PROPIEDADES
Virus del papiloma-Alfa	4	VPH -2, -27, -57	Verrugas comunes de la piel, frecuentemente en verrugas genitales en niños.
	5	VPH -26, -51, -69, -82	Lesiones benignas en mucosas, así como malignas de alto riesgo.
	6	VPH -53, -30, -56, -66	Lesiones benignas en mucosas, así como malignas de alto riesgo.
	7	VPH -18, -39, -45, -59, -68, -70	Lesiones malignas de alto riesgo en mucosas. VPH -18 más frecuente en adenocarcinomas que en carcinomas escamosos del cervix.
	8	VPH -7, -40, 43	Lesiones cutáneas y mucosas de bajo riesgo.
Virus del papiloma-Beta	9	VPH -16, -31, -33, -35, -52, -58, -67	Lesiones malignas de alto riesgo en mucosas. VPH -16 mas frecuente en carcinoma de cervix que en adenocarcinoma, y es el tipo viral más frecuente en las lesiones del cervix.
	10	VPH -6, -11, -13, -44, -74	Lesiones benignas en mucosa. VPH -6 y -11 en verrugas genitales de hombres y mujeres, condyloma acuminata del cervix, papilomas laringeos. Algunas de estas lesiones pueden progresar a la malignidad.
	1	VPH -5, -8 (por citar solo dos tipos de un género más amplio)	Lesiones cutáneas benignas y malignas en pacientes EV e inmunosuprimidos.
Virus del papiloma-Gama	1	VPH -4, -65 (por citar solo dos)	Lesiones cutáneas benignas.
Virus del papiloma-Delta	4	Virus del papiloma bovino -1 (VPB-1); (por citar solo uno)	Papilomas fibrosos en el ganado vacuno, papilomas sarcoides en caballos.
Virus del papiloma-Kappa	1	Virus del papiloma del conejo de cola de algodón (CRPV)	Lesiones cutáneas.
	2	Virus del papiloma oral en conejo (ROPV)	Lesiones en la cavidad bucal.
Virus del papiloma-Mu	1, 2	VPH -1, -63	Lesiones cutáneas como verrugas de los pies.
Virus del papiloma-Uta	1	VPH -41 (no relacionado con ningún otro tipo de VPH)	Lesiones cutáneas.
Virus del papiloma-Xi	1	VPB -3, -4	Papilomas en el canal alimentario en ganado vacuno.

2.6.- EPIDEMIOLOGÍA

Las estimaciones epidemiológicas sugieren que la prevalencia mundial de la infección por VPH es del 9% al 13%, o aproximadamente 630 millones de personas(46), estimaciones obtenidas a partir de estudios de citologías cervicales que muestran la prevalencia del ADN del VPH determinado por reacción de polimerasa en cadena o de captura de híbridos en las mujeres de los ensayos seleccionadas en varias zonas geográficas (13,3% en Ontario, Canadá; 14,5% en el Estado de Morelos, México; 16,6% en Concordia, Argentina, 15,3%

en Reims, Francia, el 40,2% -41,6% en Harare, Zimbawe, y 18% en la provincia de Shanxi, China)(47, 52).

Figura 9. Carga de la infección por el virus del papiloma humano; incidencia mundial anual estimada.

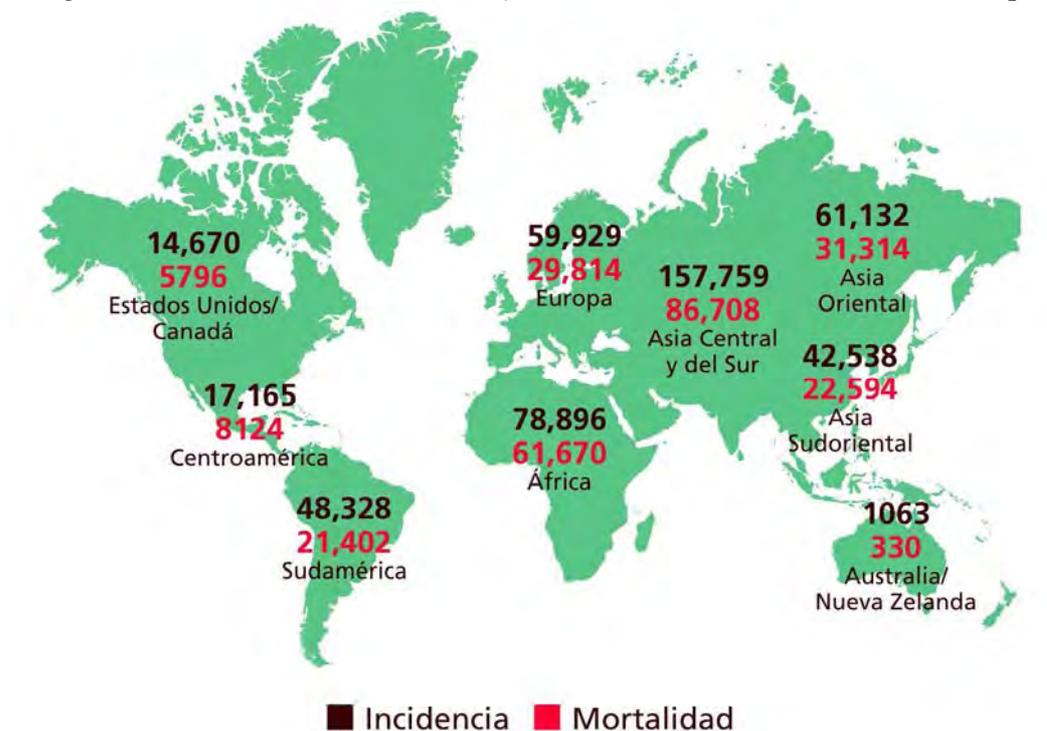


En los Estados Unidos, el VPH es una de las infecciones más comunes. Los centros para el Control y Prevención de Enfermedades ha informado que el riesgo de adquirir la infección por VPH en los hombres y mujeres sexualmente activos es al menos del 50%. Alrededor de los 50 años de edad, por lo menos el 80% de las mujeres han adquirido la infección por VPH genital. Se estima que 6,2 millones de hombres y mujeres sexualmente activos en los Estados Unidos se infectan con el VPH cada año(53), el 74% de estas infecciones se adquieren entre los 15 y 24 años de edad, lo que representa el 25% de aquellos que comienzan vida sexual activa en EE.UU.(54). En la actualidad, existe un estimado de 20 millones de personas infectadas con el VPH en el USA. (55).

Más del 90% de las verrugas anogenitales se asocian con el VPH tipos 6 y 11(56). La prevalencia de las verrugas anogenitales se ha informado que es más alta en las mujeres 20-24 años de edad (6,2 casos por 1.000 años-persona) y los hombres 25-29 años de edad (5,0 casos por 1.000 años-persona) (57). Alrededor de 1% de los adultos sexualmente activos tienen verrugas genitales clínicamente aparentes, y al menos el 15% han presentado una

infección subclínica (58). La estimación de riesgo de desarrollar verrugas genitales es de aproximadamente el 10% (59,60).

Figura 10. **Estimados de incidencia y mortalidad** del cáncer cervicouterino por región



Adaptado de GLOBOCAN 2002, Organismo Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC), CANCERmondial.

Mundialmente, el cáncer de cuello uterino es el segundo, con el cáncer de mama como la principal causa de cáncer en las mujeres (61), con una prevalencia global de 2,3 millones (62). Representa casi el 10% de todos los cánceres (con exclusión del melanoma) (63). Las zonas de mayor riesgo para el cáncer cervical se encuentran en África meridional y oriental, Malasia, el Caribe, y Centro America.(63)

En ausencia de programas de cribado, el CaCu se detecta demasiado tarde y conduce a la muerte en casi todos los casos. El cáncer de cuello uterino es la tercera causa más común de cáncer femenino mundial(61). Aunque la mortalidad relacionada con el cáncer de cuello uterino no está en las primeras cinco principales causas de muerte en mujeres en los Estados Unidos, es la segunda causa de muerte en mujeres entre los 20 y 39 años de edad (en segundo lugar es el cáncer de mama). (64)

Históricamente se pensaba que el embarazo tenía un efecto adverso en la evolución del cáncer cervical, sin embargo estudios más recientes demostraron que no existe diferencia

en la supervivencia entre embarazadas e ingravidas con cáncer cervical, cuando se comparan por edad, etapa y año del diagnóstico. Al parecer, el embarazo no altera de manera importante el avance o el pronóstico del cáncer cervical. (65)

El riesgo de neoplasia cervical y sus precursores es similar entre embarazadas e ingravidas, con una incidencia de 1.26 a 2.2% de lesiones intraepiteliales escamosas detectadas en la citología durante el embarazo. Alrededor de 86% de las lesiones intraepiteliales escamosas que se identifican durante la gestación se clasifican como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de bajo grado (NIC 1). El otro 14% son lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (NIC 2, 3). En 0.19 a 0.53% de embarazadas se encuentra NIC diagnosticada histológicamente, pero el carcinoma del cuello uterino es raro y sólo ocurre en 1 de 3,000 embarazos. (66)

Según Lazcano, “este virus es muy frecuente y se estima que cerca de 70% de la gente con una vida sexual activa ha estado en contacto con él”. Esta aseveración la comparten los médicos Silvia Francheschi, Gary Clifford y Martín Plummer, de (IARC) al dar a conocer en su estudio “Prevención Primaria para el VPH”, publicado en un número especial de la Revista de Salud Pública de México, que en algún momento, entre 5 y 40% de mujeres y hombres adultos en todo el mundo son portadores del virus.

La infección por VPH de bajo riesgo, sobre todo por los VPH 6 y 11, produce lesiones anogenitales benignas o infecciones subclínicas que suelen ser transitorias y casi siempre se resuelven, pero los de alto riesgo se asocian con displasias y carcinomas cervicales, y se ha comunicado que las infecciones persistentes por los tipos 16 y 18 se relacionan con el desarrollo de cáncer de cuello uterino. (67,68,69)

El VPH 16 es el causante de 50 a 60% de casos de CaCu en el mundo y el VPH 18 lo es de 10 a 12%.

- Cada año, 490 mil mujeres son diagnosticadas en el mundo con el VPH. De ellas, 231 mil mueren a causa del CaCu, 80% en países del Tercer Mundo.
- Latinoamérica, el sureste de Asia y el sur de África son las regiones con mayor presencia de VPH e incidencia de CaCu en el mundo.
- Los 10 países con mayor número de casos en Latinoamérica son, en orden descendente: Haití, Nicaragua, Bolivia, Ecuador, Paraguay, El Salvador, México, Perú, Guatemala y Honduras.
- En el 2000, se registraron en América Latina 76 mil casos de CaCu y 30 mil muertes por su causa; 6, 650 fueron en México.
- Argentina, Uruguay y Puerto Rico son países de baja incidencia, al igual que Europa occidental. Estados Unidos reporta frecuencia en comunidades de inmigrantes.

FUENTE: OMS, IARC, NATIONAL CANCER INSTITUTE, GLOBOCAN.

Las estimaciones epidemiológicas sugieren que la prevalencia mundial de la infección por VPH es del 9% al 13%, o aproximadamente 630 millones de personas, estimaciones obtenidas a partir de citologías cervicales muestran la prevalencia del ADN del VPH determinada por la reacción del PCR o los ensayos de captura de híbridos en las mujeres de determinadas zonas geográficas varía (13.3% en Ontario, Canadá; 14.5% en el edo. de

Morelos, México; 16.6% en Concordia, Argentina; el 15.3% en Reims, Francia, el 40.2% al 41.6% en Harare, Zimbawe y 18% en la provincia de Shanxi, China). (70,71,72,73,74,75).

2.6.1.- El riesgo de muerte en México

- En México, de 1990 a 2000, se registraron oficialmente 48,761 muertes por CaCu, con un promedio de 12 mujeres fallecidas cada 24 horas.
- Los primeros 10 estados con mayor riesgo de mortalidad por CaCu son: Morelos, Chiapas, Nayarit, Yucatán, Tabasco, Quintana Roo, Oaxaca, Michoacán, Baja California y Colima.
- Los de menor riesgo son: D.F., Nuevo León y Zacatecas.
- Las comunidades rurales de menos de 15 mil habitantes representan 40% de la mortalidad.

FUENTE: "CANCER CERVICAL, ENFERMEDAD DE LA POBREZA", ESTUDIO DE PALACIO MEJÍA, LAZCANO, RANGEL, HERNÁNDEZ, PARA SALUD PÚBLICA DE MÉXICO, NÚMERO ESPECIAL.

2.7.- DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

2.7.1.- Diagnóstico

La detección temprana y el tratamiento oportuno del VPH en lesiones precancerosas pueden prevenir la progresión a cáncer. Los métodos principales de diagnóstico han sido la histopatología y métodos citológicos como el papanicolaou, que busca cambios en las células de la zona de transformación. Recientemente se han introducido los métodos moleculares para detectar VPH en muestras VPH en muestras clínicas. El sistema actual de reporte para clasificar la citología cervical es el de Bethesda. Las pacientes con resultados de papanicolaou anormales que no tienen una lesión cervical seria con evaluadas por colposcopia y por toma de biopsia o cono.

Algunas técnicas de biología molecular son utilizadas hoy en día en forma muy eficiente para el diagnóstico de las infecciones por distintos tipos de virus del papiloma humano (VPH) (76), que cuando son persistentes, se consideran necesarias para el desarrollo de cáncer del cuello uterino(77); sin embargo, es importante considerar varios aspectos: si bien, en el desarrollo de cáncer de cuello uterino, las infecciones persistentes con ciertos tipos de VPH, llamados de "alto" riesgo, son consideradas como necesarias para su desarrollo, éstas no son suficientes y, en la mayoría de los casos, son transitorias (en especial en las mujeres jóvenes, menores de 25-30 años). En general, las infecciones primarias y las lesiones citológicas e histológicas menores son frecuentes en las mujeres jóvenes, pero son las infecciones persistentes con algún VPH del grupo de "alto" riesgo, las que incrementan cerca de 250 veces el riesgo de una mujer para desarrollar cáncer(78). Es por ello que las mujeres negativas a estos tipos de VPH (a pesar de haber padecido una infección en algún momento de su vida) no están en riesgo de padecer cáncer del cuello uterino. De ahí que el valor predictivo negativo de una prueba molecular para VPH de "alto" riesgo sea de gran utilidad (79).

Las técnicas actuales de amplio uso permiten el diagnóstico certero de infección por VPH y con ello apoyan y complementan el diagnóstico clínico, particularmente en la mujer; son principalmente dos (80):

- Captura de híbridos II.
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Estas dos técnicas son factibles de realizar en muestras tomadas mediante el empleo de citobrush, brocha o biopsia.

En el caso de la captura de híbridos, la prueba distingue hasta 13 tipos distintos de VPH de riesgo oncogénico “alto”, entre los que se encuentran los tipos 16 y 18, principalmente, y los tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68. La prueba se basa en la formación y posterior captura de híbridos de ADN viral y sondas de RNA específicas contra estos 13 tipos virales distintos. Los híbridos son capturados mediante el empleo de anticuerpos específicos, y posteriormente reconocidos por anticuerpos similares, pero que llevan ahora acoplada la enzima fosfatasa alcalina que genera una reacción luminiscente en presencia del sustrato adecuado (81).

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizan diferentes juegos de oligonucleótidos que permiten la detección de un gran número de tipos virales que incluyen particularmente los tipos 16 y 18, pero también incluyen muchos tipos de “bajo” riesgo, como el 6 y 11. Para ello se han seleccionado regiones específicas del genoma de estos virus, que incluyen tanto las regiones tempranas y tardías, así como la región de control (LCR). Esta prueba requiere de controles muy estrictos, por su elevada propensión a dar falso positivos (82).

Lamentablemente, estos métodos diagnósticos no están todavía al alcance de todos los centros de atención de esta patología y tienen un costo importante; sin embargo, su uso ha aumentado considerablemente en los últimos años y se espera se incremente en los próximos y con ello puedan disminuir su costo. Además de esos métodos, que actualmente se utilizan en el diagnóstico de la infección por VPH de “alto” riesgo y son muy confiables, existen otras alternativas que pueden realizarse, como la hibridación in-situ, Inmunohistoquímica, Microchips.

Creemos que si bien en los países en vías de desarrollo, la utilización de estos sistemas de diagnóstico es relativamente cara, constituyen un sistema objetivo, totalmente reproducible para el diagnóstico de las infecciones persistentes por VPH, que son las que presentan el riesgo de terminar en el desarrollo de un carcinoma invasor, si no son detectadas a tiempo. (83,84)

Para el correcto diagnóstico etiológico, ya que los VPH no crecen en los medios habituales de cultivo y los estudios serológicos sólo tienen una validez limitada, deben utilizarse técnicas de detección de ácidos nucleicos, de las cuales la amplificación genómica mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se considera la más adecuada. Los VPH que en general se encuentran relacionados con lesiones en el tracto genital comparten en su genoma una homología en la secuencia de las regiones L1 y E6, y es esta región

común a los VPH genitales la que se amplifica mediante iniciadores “consenso”. La utilización posterior de sondas de hibridación permitirá su tipificación, que es sumamente importante debido a la asociación de ciertos tipos con el cáncer genital.

Considerando que en los últimos años se ha observado un notable incremento de la infección por VPH, y que se ha confirmado la relación etiológica de ciertos genotipos con el cáncer genital.

2.7.2.- Tratamiento actual.

En la actualidad hay varias opciones terapéuticas para las diversas manifestaciones de las enfermedades por el VPH. La mayoría de estos tratamientos entrañan intervenciones físicas, químicas o inmuno moduladoras dirigidas contra las lesiones, más que contra el virus mismo. (85). Ninguna de ellas ofrece una eficacia consistente ni es particularmente bien tolerada.

Las verrugas anogenitales por lo común se tratan con medidas ablativas superficiales, como escisión quirúrgica, electrocirugía o crioterapia, o mediante un tratamiento antimicótico con podofilina o podofilox, administrado localmente. La administración de interferón alfa dentro de las lesiones o la terapia con láser pueden ser opciones adecuadas para el tratamiento de segunda línea de las lesiones resistentes.

También se han usado otros tratamientos análogos de las pirimidinas, como 5-fluorouracilo o idoxuridina; inducción del interferón alfa con imiquimod; o análogos de los ácidos nucleicos, como cidofovir o ribavirina. Los tratamientos para las neoplasias intraepiteliales o el cáncer del cuello uterino, la vagina o la vulva han incluido 5-fluorouracilo tópico, radioterapia o cirugía, aunque en la actualidad se prefieren la escisión electroquirúrgica con asa (LEEP, por sus siglas en inglés), la cirugía con láser y la crioterapia. En el tratamiento del cáncer cervicouterino también pueden emplearse esquemas citotóxicos con podofilina y vidarabina. (25)

2.7.3.- Ensayos en vacunas

La profilaxis con la vacunación contra el VPH representa una prometedora estrategia para prevenir la ocurrencia del CaCu y otras enfermedades relacionadas con el VPH.

La administración de la vacuna tetravalente VPH (tipos 6, 11, 16, 18) L1 virus como la partícula (VLP), que es la vacuna (Gardasil®, Merck & Co., Inc.) administrada entre los 16 y 26 años de edad induce una potente respuesta anti-VPH 6, 11, 16 y 18.

La vacuna contra el VPH se ha demostrado que persiste en los sujetos vacunados a través de 4,5 años después de la vacunación. La vacuna es muy eficaz a 5 años posteriores a la administración (86). Lo que aún no se ha determinado, es cuánto tiempo se generan y persiste el efecto de los anticuerpos protectores en respuesta a la inmunización con la vacuna tetravalente contra el VPH, tomando en cuenta que mujeres y hombres siguen en

riesgo de contraer una infección por VPH a lo largo de su vida sexualmente activa.

La duración de la protección conferida por las vacunas pueden variar. Una de las características de las vacunas que confieren a largo plazo protección inmune es el desarrollo de la memoria inmunológica, que se define como la generación inducida por la vacuna de larga vida una memoria de las células inmunitarias que, al volver a la exposición a los antígenos, generan una respuesta inmune vigorosa que impida la infección.

2.7.1.1.- Gardasil.

La vacuna Gardasil está producida por la Compañía Farmacéutica Sanofi Pasteur MSD. Es una vacuna tetravalente recombinante (papilomavirus humano de los tipos 6, 11, 16, 18), fabricada mediante el ensamblaje, por ingeniería genética de las VLP (partículas semejantes a virus), conformadas por las proteínas L1 de las cápsulas de los papilomavirus humanos de tipo 6 (VPH 6), 11 (VPH 11), 16 (VPH 16) y 18 (VPH 18).

Cada dosis tiene un volumen de 0,5 ml y contiene 20 µg, 40 µg, 40 µg, 20 µg de la proteína L1 de los tipos de VPH 6, 11,16 y 18 respectivamente.

La vacuna tiene un periodo de validez de 3 años almacenada entre 2-8° C.

La administración de la vacuna es intramuscular. El esquema de vacunación consta de tres dosis administradas de acuerdo a la siguiente posología: 0, 2 y 6 meses.

La indicación está basada en la demostración de eficacia en mujeres adultas de edades comprendidas entre los 16-26 años de edad y en la demostración de inmunogenicidad de niños/as y adolescentes (de género masculino y femenino) de 9-15 años. La vacuna no debe administrarse a niños menores de 9 años ni tampoco a sujetos con la respuesta inmune alterada. La eficacia protectora no ha sido evaluada en hombres.

Gardasil sólo protege contra la enfermedad causada por los VPH vacunales, no se ha demostrado que proteja frente a VPH no vacunales.

La vacuna no está indicada para el tratamiento de cáncer cervical, ni para el tratamiento de las displasias CIN 2/3, VIN 2/3 o verrugas genitales puesto que no tiene efectividad terapéutica.

2.7.1.2.- Cervarix

Cervarix ha sido desarrollada para prevenir la enfermedad causada por los tipos 16 y 18 del virus del papiloma humano (VPH). Está producida por la Compañía Farmacéutica Glaxo Smith Kline Biologicals S.A. Es una vacuna recombinante compuesta por partículas VLP tipo L1 de la cápside de los papilomavirus humanos de tipo 16 y 18 (VPH 16 y VPH 18). La vacuna ha sido formulada con un nuevo sistema adyuvante, el AS04, que contiene 500 µg de hidróxido de aluminio y 50 µg de monofosforil lípido A 3-desacilado (MPL) con el objetivo de inducir una respuesta inmunitaria más potente y duradera. Al igual que la anterior vacuna, al no contener material genético, no puede causar infección en el huésped.

Cada dosis tiene un volumen de 0.5 ml y contiene 20 µg de la proteína L1 de cada uno los tipos de VPH vacunales (VPH 16 y VPH 18).

Su periodo de validez es de 3 años almacenada entre 2-8° C.

La administración de la vacuna es intramuscular. El esquema de vacunación son tres dosis administradas de acuerdo a la siguiente posología: 0, 1, 6 meses.

Debido a la escasez de resultados de eficacia y seguridad la vacuna, se encuentra en una fase preliminar.

3. JUSTIFICACION

Se ha postulado que los cambios fisiológicos (87,88) e inmunológicos que ocurren en el epitelio cervical durante el embarazo predisponen a un incremento del riesgo de infección por VPH y su progresión(89,90). También se ha informado que mujeres infectadas con VPH muestran mayor persistencia y progresión de la infección durante y después del embarazo; sin embargo, no se encuentran bien documentados los mecanismos por medio de los cuales el embarazo modifica el riesgo de la infección y la persistencia y progresión a lesiones clínicas.(90,91)

En nuestro trabajo hemos utilizado el PCR que en tiempo real ha mejorado la sensibilidad, aunque con el inconveniente de generar falsos positivos, sobre todo por la heterogeneidad de los diferentes genotipos a los productos de PCR de amplio espectro. Además, aunque posibilita la cuantificación del DNA, y podría distinguir infecciones clínicamente relevantes, aún no se ha establecido cuál sería el umbral significativo.

Para la tipificación parece que lo más adecuado es utilizar sondas de hibridación, aunque existen diferentes técnicas, como la detección en placa de múltiples pocillos (92), que cuenta con la desventaja de necesitar un gran volumen de producto amplificado; la utilización de sondas inmovilizadas(93); o la hibridación con microseries de sondas (*microarrays* o *chips*), que amplía la detección de infecciones múltiples y parece prometedor.(94)

Más de un 80% de las mujeres sexualmente activas sufren una infección por VPH a lo largo de su vida(95). Los tipos 6 y 11 son los principales causantes de lesiones anogenitales, que se manifiestan en forma de verrugas y aparecen en el 1% a 2% de los adultos; su tratamiento es caro, doloroso y con frecuentes recidivas.

La asociación entre determinados tipos de VPH de alto riesgo y el cáncer de cérvix está bien establecida(96). En el 99,7% de los cánceres de cuello uterino existe DNA del VPH, siendo el tipo 16 la causa del 57,6%, y si consideramos también el tipo 18 asciende al 71,7%(97).

Aunque los métodos de detección sistemática del VPH reducen el riesgo, no previenen la infección ni el desarrollo de lesiones pre cancerosas, que requieren un seguimiento y tratamiento cuidadosos, por lo que se deben considerar también las posibles estrategias de prevención(98).

Parece probable que la combinación profiláctica y terapéutica de una vacuna ofrezca una significativa reducción de la muerte por cáncer cervical en el mundo (99). Al efecto beneficioso de la vacunación frente a los tipos oncogénicos de VPH (16 y 18) podría añadirse una vacuna contra los tipos no oncogénicos 6 y 11 para la profilaxis de verrugas genitales en hombres y mujeres, pues estas lesiones, si bien son de bajo riesgo, hay que tenerlas también muy en cuenta porque aunque el pronóstico es benigno son difíciles de tratar y muy costosas.(100)

Por todo lo dicho, consideramos que el VPH no sólo hay que detectarlo y genotipificarlo, sino también tratarlo y si es posible prevenir su infección. Una vacuna multivalente dirigida contra los VPH 6, 11, 16 y 18 podría ser eficaz frente a los tipos de VPH que causan el cáncer y las verrugas genitales, reduciendo sustancialmente las infecciones y la enfermedad clínica causada por estos tipos.

4. HIPOTESIS

¿ Si el embarazo es considerado como un estado de respuesta inmune comprometida entonces, el número de casos de pacientes infectadas por virus del papiloma humano debe ser mayor que en la paciente no embarazada ?

5. OBJETIVOS

Conocer la prevalencia del Virus del Papiloma Humano en mujeres embarazadas.

5.1. OBJETIVO GENERAL:

Determinar la prevalencia del Virus del Papiloma Humano en pacientes embarazadas del Hospital General Dr. Manuel Gea González.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

Determinar las cepas oncogénicas del virus del papiloma humano más frecuente en nuestra población de mujeres embarazadas.

Al conocer la cepa viral, saber si las vacunas existentes son efectivas.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Tipo de Estudio Epidemiológico

6.2. Ubicación Temporal y Espacial

Pacientes embarazadas que acudan a la consulta externa de obstetricia y en el servicio de urgencias del Hospital General Dr. Manuel Gea González, durante el periodo del 01 de Marzo al 31 de Mayo del 2009.

6.3. Criterios de Selección de la Muestra

a) Pacientes embarazadas de entre 18 y 35 años de edad, que acudan a la consulta externa de Obstetricia del Hospital General Dr. Manuel Gea González del 01 de Marzo al 31 de Mayo del 2009.

b) Pacientes embarazadas de entre 18 y 35 años de edad, que acudan al servicio de urgencias Gineco-Obstétricas del Hospital General Dr. Manuel Gea González del 01 de Marzo al 31 de Mayo del 2009.

Criterios de Inclusión

a) Toda paciente embarazada de entre 18 y 35 años de edad, sin importar semanas de gestación entre el 1 de marzo y 31 mayo del 2009.

b) Que acepte participar en el estudio.

c) Que firme consentimiento bajo información.

Criterios de Exclusión

a) Pacientes embarazadas mayores de 36 años y menores de 17.

b) Que no acepte participar en el estudio.

c) Diagnóstico previo de VPH y/o tratamiento por mismo padecimiento

d) Que no tenga complicaciones obstétricas que contraindiquen toma de las muestras.(placenta previa, preeclampsia, infecciones vaginales, ruptura prematura de membranas)

Criterios de Eliminación

a) Muestra contaminada en laboratorio.

b) Pacientes en las que la muestra no se conservó a temperatura adecuada (-4C).

- c) Muestra que no se haya transportado de manera adecuada o extraviada.
- d) Muestras que después del análisis por la reacción de la polimerasa (PCR) resulten negativos a DNA del gen constitutivo de b-globina.

6.4. Variables

Independientes (CAUSA)		Dependientes. (EFECTO)	
Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)	Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)
Estado Civil	Ordinal	VPH por PCR	Dicotómica
Menarca	Intervalo	Cepa	Ordinal
Num. Parejas sex.	Intervalo	Cepa oncogénica	Dicotómica
Edad gestacional actual	Intervalo	Cepa no oncogénica	Dicotómica
Edad	Intervalo		
Tabaquismo	Ordinal		
IVSA	Intervalo		
Fecha de última regla	Intervalo		
Uso de condón	Nominal		

6.5. Tamaño de la Muestra

Estudio descriptivo, la frecuencia con que se presenta el evento principal es de 17 % con margen de error de: 0.5 con nivel de potencia de la prueba de 95% con un número total de casos del estudio de 250 pacientes.

6.6. Métodos de Laboratorio

6.6.1.- Procesamiento de las muestras.

Se obtuvieron muestras de células exfoliadas del cérvix de pacientes embarazadas del HGDMGG. El ADN se extrajo de las citologías a través de la técnica descrita por Sambrook et al. (1989), que brevemente consiste en :

1) Disgregar la muestra en buffer de lisis 1ml (Tris.HCL 10mM. EDTA .1M pH 8, SDS .5%, Proteinasa K 200ug/ml).

2) Incubar a 37°C con agitación toda la noche. Seguido por extracciones con fenol cloroformo. Posteriormente la muestra se precipita en etanol al 100% y 1/10 vol. Acetato de amonio 7.5M. Dejando a -70°C por 2 horas.

3) se centrifugo las muestras a 13,000 rpm durante 15 minutos.

4) Se quitó de nuevo el sobrenadante y secando hasta que el pellet obtuvo un color blanco aperlado.

El ADN obtenido después de la centrifugación se cuantificó por espectrofotometría (EPPENDORF).

6.6.2.- Amplificación y Secuenciación:

Para corroborar que el ADN obtenido fuera de calidad y estuviera en cantidad suficiente para la amplificación por PCR, se utilizaron oligonucleótidos que amplifican un fragmento del gen B-globina. Los oligonucleótidos utilizados fueron GH20 y PC04 (GH20 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'; PC04 5'-CAACTTCATCCACGTTTCACC-3') que amplifican un fragmento de 268pb (Resnick et al; 1990). Las condiciones de PCR fueron las siguientes, en 25 ul: dNTPs 0.2mM, MgCL2 4mM, GH20 1pmol, PC04 1 pmol, Taq Promega 1U. Se realizaron 40 ciclos de amplificación en un termociclador Master Cycle Gradiente (EPPENDORF), cada ciclo incluía 30 seg de desnaturalización a 94°C, alineamiento a 55°C por 30 seg y elongación por 45 seg a 72°C. El primer ciclo fue precedido por una desnaturalización de 5 min a 94°C y después del último ciclo se realizó un periodo de elongación de 7 min a 72°C, 5µl de cada uno de los productos de PCR se corrieron en gel de Agarosa al 1.5% para comprobar los resultados.

Todas las muestras negativas para ésta reacción se excluyeron de los ensayos posteriores.

Tabla 1. Localización y secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR y la secuenciación.

Nombre	Localización del fragmento amplificado	Región del genoma que amplifican	Secuencia (5'-3') ^a	Tipo
MY09	6583-7034	L1	CGTCCMARRGGAWACTGATC	Varios
MY11 ^b			GCMCAGGGWCATAAAYAATGC	
GP5+	6624-6746	L1	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC	Varios
GP6 ^c			GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	
FO48	48-532	E6	GAACCGAAACCGGTTAGTAT	16
R551			GGGTTTCTCTACGTGTTCTT	
F046	46-590	E6	TTGAACCGAAACCGGTTAGT	16
R590			TCATGCAATGTAGGTGTATCTCC	
F204	204-419	E6	GCAACAGTTACTGCGACGTG	16
R419			GGACACAGTGGCTTTTGACA	
LCR7450F	7747-7810	LCR	TCAACCGAATTCGGTTGCAT	16
LCR813R			ACCTTTACACAGTTCATGTA	

^a Código de oligonucleótidos degenerados: M= A+C, R= A+G, W= A+T, Y=C+T

^b (Manos *et al.*, 1989)

^c (de Roda Husman *et al.*, 1995)

Para determinar la presencia del virus y los tipos y variantes presentes en las muestras de las pacientes, se utilizó la amplificación de una región del gen L1 por medio de reacciones de PCR y posteriormente los productos de PCR amplificados se secuenciaron para determinar los tipos virales presentes. Para todas las reacciones de PCR se incluyeron controles positivos y negativos. Los controles positivos consistían en ADN extraído de las líneas celulares de cáncer cervicouterino con VPH 16, SiHa y CasKi. Los controles negativos consistieron en agua estéril sin ADN de ningún tipo.

Las condiciones generales para la amplificación por PCR fueron las siguientes en 25µl: dNTPs 0.2mM, MgCl₂ dependiendo del oligonucleótido (Tabla2), Forward 1pmol, Reverse 1pmol, Taq Promega 1U. Se utilizaron 40 ciclos de amplificación, cada ciclo incluía 30 seg de desnaturalización a 94°C, la temperatura de alineamiento (T_m) dependiendo del oligonucleótido (Tabla 2) por 30 seg y elongación por 45seg a 72°C. El primer ciclo fue precedido por una desnaturalización de 5 min a 94°C y después del último ciclo se realizó un periodo de elongación de 7 min a 72°C. 5µl de cada uno de los productos de PCR se corrieron en gel de Agarosa al 1.5%, para comprobar los resultados.

Tabla 2. Condiciones específicas de magnesio y Tm para los oligonucleótidos utilizados

Oligonucleótido	Longitud Fragmento	Tm	Concentración de Mg
MY09/MY11	450 pb	55°C	4mM
GP5+/GP6+	150 pb	48°C	3mM
F048/R551	513 pb	50°C	2.5mM
F046/R590	550 pb	55°C	2mM
F204/R419	220 pb	55°C	2mM
LCR7450F/LCR813R	363 pb	58°C	2mM

6.6.3.- Amplificación del gen L1

La presencia del virus se determinó por medio de la amplificación por PCR con los oligonucleótidos consenso MY09/MY11 y GP5+/GP6+ (Tabla 1) que amplifican una región del gen L1 de varios tipos diferentes de VPH.(de Roda Husman et al; 1995; Manos et al; 1989).

El producto de PCR de las muestras positivas para MY09/MY11 y GP5+/GP6+ se limpió con el QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN). Posteriormente se realizó la secuenciación automática en el secuenciador ABI PRISM 3100 (PE Biosystems). Se utilizó BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit para la reacción de secuencia.

Para la reacción de secuencia se utilizaron 5.5µl del producto del PCR purificado, 1.5µl de Big Dye terminator v.3, 2µl de Buffer 5x y 1µl del oligonucleótido (1.6pmol) y se realiza una reacción de PCR con las condiciones de ciclado especificadas en la tabla 3. Una vez terminada la amplificación se procedió a purificar los productos con una precipitación con etanol. A cada muestra se le agregaron 3µl de 3M NaOAc pH 4.6, 62.5µl de non-denatured 95% etanol y 14.5µl de agua estéril, se mezclaron los tubos y se les dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron por 20 minutos, se quitó el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol al 70% y, se volvió a centrifugar por 5 minutos. Finalmente se quitó el etanol y se dejó secar la pastilla, la cual se resuspendió en 20µl de formamida HiDi. Antes de meter las muestras al secuenciador se desnaturalizaron por 2 minutos a 96°C y se colocaron en hielo, para después cargar la placa de secuencia. Para determinar el tipo de VPH las secuencias se compararon con las bases de datos de GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) por medio del programa BLAST (Altschul et al; 1997).

Tabla 3. Condiciones de ciclado y temperatura para la reacción de secuenciación

Temperatura (° C)	Tiempo (min)	Ciclos
94	3:00	1
96	0:30	
50	0:15	25
60	4:00	
4	∞	1

6.6.4.- Amplificación de E6 y LCR de VPH 16

Las muestras que resultaron positivas para el tipo 16 se amplificaron con oligonucleótidos específicos para la región E6 y para la LCR, para poder determinar las variantes. Los oligonucleótidos utilizados para E6 fueron FO48/R551, F046/R590 y F204/R419 (Tabla 1) con las condiciones de magnesio y Tm específicas para cada oligonucleótido (Tabla 2). También se utilizaron oligonucleótidos de LCR : LCR7450F/LCR813R (Tabla 1) con las condiciones de magnesio y Tm específicas para éste oligonucleótido (Tabla 2). Los productos de PCR se corrieron en gel de Agarosa al 1.5% para comprobar resultados y se limpiaron con el QIAquick PCR Purification kit (QUIAGEN) y se secuenciaron directamente con las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Una vez obtenida la secuencia se compararon con las secuencias consenso y se buscaron los cambios ya reportados (Tabla 4) para determinar las variantes.

6.7. Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron con el programa SPSS v13.0 para Windows. Los datos de las pacientes se recolectaron en tablas, en donde para cada paciente se especificó con estadística descriptiva.

Después del análisis se complementaron los datos de presencia o ausencia de VPH, así como tipificación, para saber si había diferencia con respecto a las variables, se utilizaron las pruebas de Mantel-Haenszel.

6.8. Descripción Operativa del Estudio

- a) Se seleccionó a las pacientes embarazadas de la consulta externa y del servicio de urgencias de Gineco-obstetricia de entre edades 18 y 35, sin importar semanas de gestación, durante el periodo del 1 de Marzo al 31 de Mayo del 2009.
- b) A todas las pacientes se les explicó el objetivo de la toma de muestra y se firmó un consentimiento sobre su participación voluntaria en el trabajo.

- c) Se realizó una encuesta para la recolección de datos demográficos, reproductivos y sexuales.
- d) Se tomó muestra de citología cervical con citobrush, en el área de urgencias Gineco-obstétricas o consulta externa de Ginecología. Se etiquetó y se almacenó en refrigeración a -4°C en el INCAN.
- e) Se procesaron las muestras en el Instituto Nacional de Cancerología en la Unidad de Investigaciones Biomédicas, laboratorio núm.4 con la Dra. Lizano Soberón.
- f) Se tomó PCR de cada muestra, sometiendo a dos fases el estudio de laboratorio, correspondiendo la primera fase a detección de VPH y la segunda fase en tipificación de cepa.
- g) Pacientes positivas a VPH se derivaron a la consulta externa del departamento de Displasias de HGDMGG como parte del seguimiento.
- h) Pacientes negativas a VPH se continuó control obstétrico por parte del servicio de la consulta externa de Obstetricia.

7. RESULTADOS

Con el objeto de establecer la prevalencia del virus del papiloma humano en una muestra de pacientes mexicanas embarazadas, se analizaron 100 pacientes, tomándose raspados de células exfoliadas de cérvix. Todas las pacientes provenían del Hospital General Dr. Manuel Gea González.

7.1.- Porcentajes de muestras positivas y muestras negativas a B-Globina

Tabla 4. Porcentajes de B-Globina en muestras.

B-globina	
+	90
-	10
Total	100

7.2.- Porcentajes y gráficos para muestras positivas de MY y LC

Tabla 5. Porcentaje de muestras positivas para MY

MY	
+	22
-	78
Total	100

Gráfico 1. Porcentaje de muestras positivas para MY

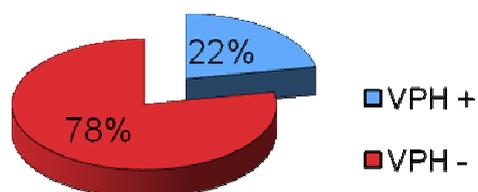
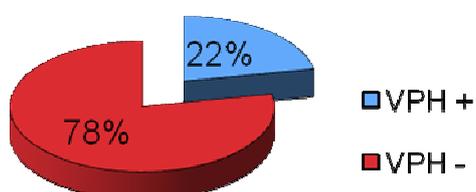


Tabla 6. Porcentaje de muestras positivas para LC

LC	
+	22
-	78
Total	100

Gráfico 2. Porcentaje para muestras positivas de LC

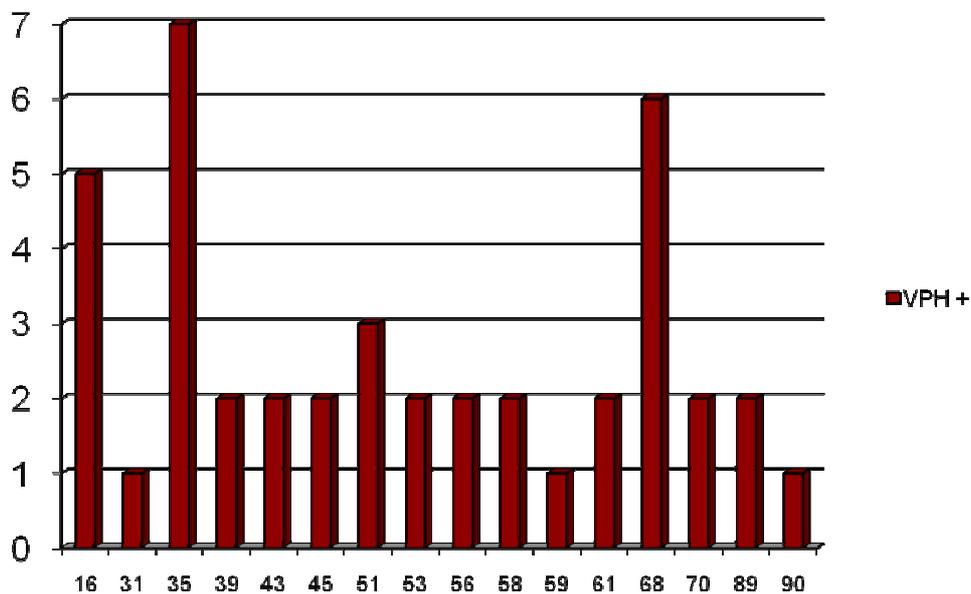


7.3.- Tabla y gráficos de porcentajes de muestras positivas a VPH según tipificación

Tabla 7. Porcentaje de muestras positivas para VPH según tipificación

Tipificación	Casos	%
16	5	11.9
31	1	2.3
35	7	16.6
39	2	4.7
43	2	4.7
45	2	4.7
51	3	7.1
53	2	4.7
56	2	4.7
58	2	4.7
59	1	2.3
61	2	4.7
68	6	14.2
70	2	4.7
89	2	4.7
90	1	2.3
Total	42	100

Gráfico 3. Porcentaje de muestras positivas a VPH según tipificación



7.4.- Tablas y gráficos de acuerdo a edad de las pacientes.

Tabla 8. Pacientes estudiadas de acuerdo a edad.

Edad	Casos
18	19
19	8
20	15
21	8
22	6
23	7
24	4
25	2
26	6
27	6
28	0
29	4
30	0
31	3
32	0
33	1
34	3
35	8

Gráfico 4. Pacientes estudiadas de acuerdo a edad.

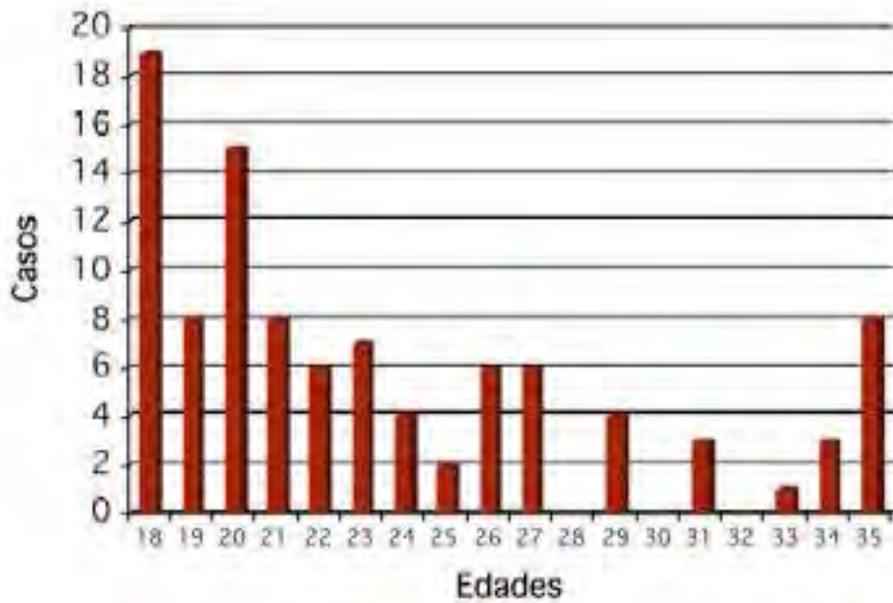


Tabla 9. Riesgo para infección por VPH asociado a consumo de tabaco.

		Resultado viral	
		Positivo	Negativo
Tabaquismo	Positivo	12	24
	Negativo	20	44
Total		32	68

Gráfico 5. Riesgo para infección de VPH asociado al consumo de tabaco

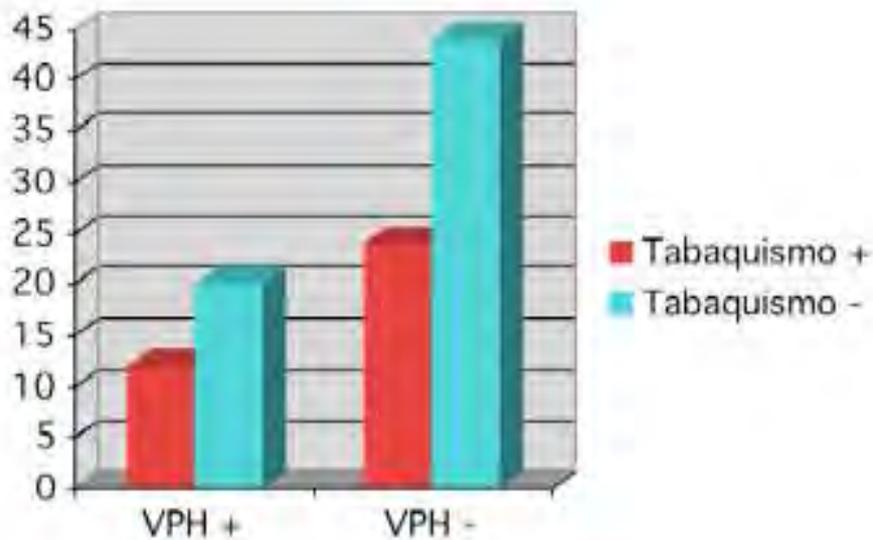


Tabla 10. Riesgo para infección por VPH asociado a IVSA

		Resultado viral	
		Positivo	Negativo
Riesgo IVSA	IVSA temprana	14	34
	IVSA > 18ª	18	34
Total		32	68

Gráfico 6. Riesgo para infección por VPH asociado a IVSA

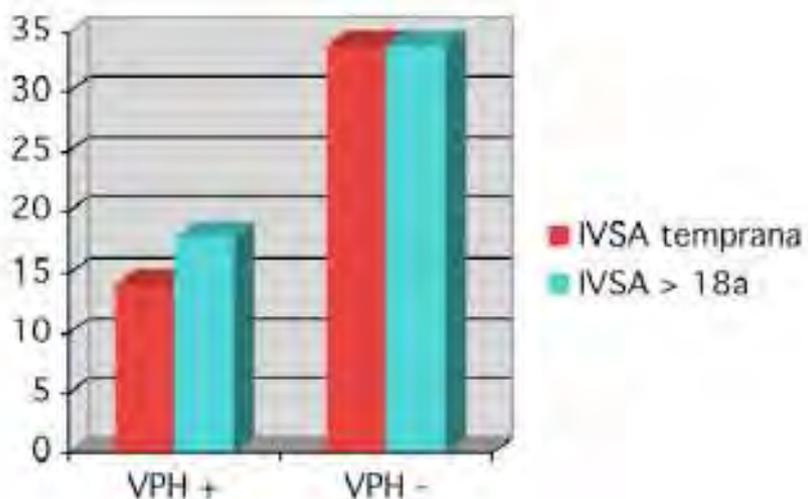


Tabla 11. Riesgo para infección por VPH asociado al número de parejas sexuales

		Resultado viral	
		Positivo	Negativo
Numero de PS	Más de una	18	19
	Solo una pareja	14	49
Total		32	68

Gráfico 7. Riesgo para infección por VPH asociado al número de parejas sexuales

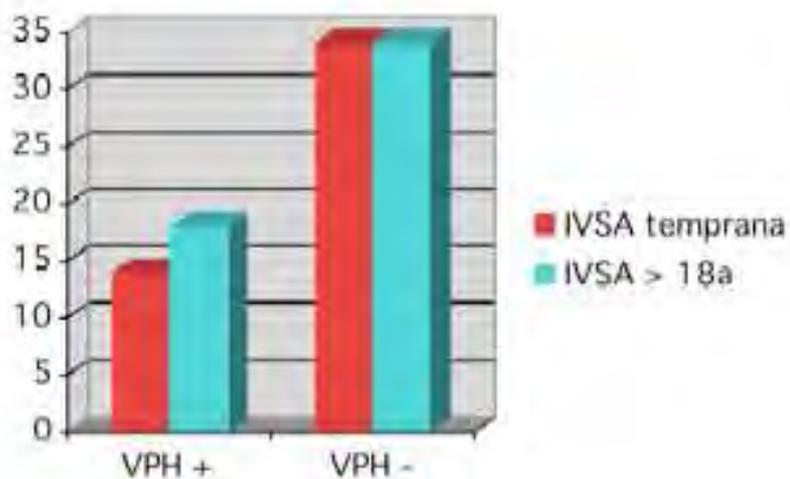


Tabla 12. Riesgo para infección por VPH asociado al uso del preservativo

		Resultado viral	
		Positivo	Negativo
Uso de preservativo	No utiliza	14	29
	Si utiliza	18	39
Total		32	68

Gráfico 8. Riesgo para infección por VPH asociado al uso del preservativo

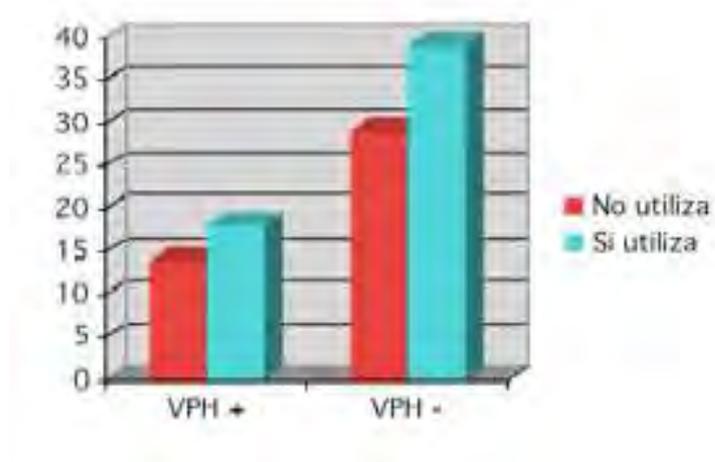
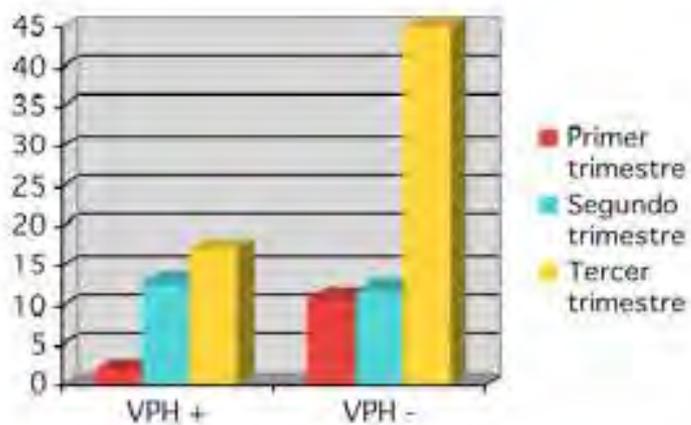


Tabla 13. Prevalencia de VPH asociado al trimestre de embarazo

		Resultado viral	
		Positivo	Negativo
Trimestre de embarazo	Primer trimestre	2	11
	segundo trimestre	13	12
	Tercer trimestre	17	45
Total		32	68

Gráfico 9. Prevalencia de VPH asociado al trimestre de embarazo



8. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Se extrajo el ADN a 100 muestras de citologías cervicales y posteriormente, para corroborar su calidad y si se tenía la cantidad suficiente para su amplificación por PCR, se usaron oligonucleótidos para el gen B-globina. En total, 10 de las muestras fueron negativas para este ensayo, por lo que se consideró que no se tenía material adecuado y se excluyeron de los demás análisis.

El 90% de las muestras fueron positivas para la amplificación del gen B-globina por PCR, por lo tanto se incluyeron en éste estudio 90 muestras con ADN adecuado. Tabla 4.

La obtención de muestras de citología cervical en aquellas pacientes donde se notó la presencia de abundante moco cervical dificultó la obtención de suficiente material celular para la extracción posterior de ADN de la muestra.

Para conocer la prevalencia del VPH en el grupo de estudio se utilizó la técnica de PCR para evaluar la presencia de ADN viral. Primero se realizó la amplificación con oligonucleótidos para una región el gen L1 que permite identificar varios tipos de VPH. Con el uso de MY09/MY11 se amplificó un fragmento de 450pb. La presencia de VPH fue detectada en el 22% de las muestras de MY y 22% de LC.

Para aumentar la sensibilidad del método utilizado, a las muestras negativas para los ensayos anteriores, se les realizó PCR anidado con los mismo juegos de oligonucleótidos amplificando con MY09/MY11. Se obtuvo una frecuencia de 44 % o sea, 44 muestras para MY y LC en total, en 2 muestras no se obtuvo suficiente material amplificado para su secuenciación. Tabla 5 y 6, Gráfico 1 y 2.

Con el fin de conocer cuales eran los tipos de VPH que se encontraban presentes en las muestras de las pacientes, se secuenciaron los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos MY09/MY11 y LCR7450F/LCR813R que consistían en fragmentos de 450 pb y 363 pb respectivamente. También se secuenciaron los productos de PCR anidado que se obtuvieron de la amplificación con ambos juegos de oligonucleótidos (fragmentos de 150pb). Las secuencias de ADN obtenidas se compararon mediante un alineamiento en BLAST con las bases de datos para determinar los tipos de VPH. El VPH tipo 35 (AR) fue el detectado con mayor frecuencia, 16.6%(7/42), en segundo lugar el VPH tipo 68 en un 14.2% (6/42) y en tercer lugar de frecuencia el VPH tipo 16 con un 11.9% (5/42) recordando que para algunas muestras se han tipificado hasta dos tipos distintos de VPH (al secuenciar muestras positivas para MY y LC). El 70 % de las muestras tipificadas corresponden a VPH de Alto Riesgo, el 4.5% a VPH de Probable Alto Riesgo, el 15.8% VPH de Bajo riesgo y un 6.7% a VPH sin clasificar. Tabla 7, Gráfico 3.

En éste estudio se encontró un posible defecto en el análisis de secuenciar aquellas muestras positivas para VPH y es que, en el sistema de secuenciación no es posible determinar si en una muestra existen varios tipo virales de VPH; además de que, si sólo se obtiene escasa cantidad de ADN no es posible secuenciar pese a su positividad en la PCR.

Se analizaron las diferencias entre las características demográficas y los factores de riesgo, para adquirir una infección por el virus del papiloma humano, obteniéndose los siguientes datos:

Del total de pacientes estudiadas agrupadas por edad y porcentajes, el grupo mayoritario fue de 18 años con el 19%, en segundo lugar con 15%, las pacientes de 20 años de edad y en tercer lugar de frecuencia con un 8% las de 19, 21 y 35 años. Tabla 8, Gráfico 4.

El tabaquismo positivo o negativo no resultó ser una variable significativa para el riesgo de infección por VPH, al calcular un riesgo estimado de $OR= 1.1$, con intervalo de confianza de 0.46 a 2.63 ($p=0.8$) Ver Tabla 9 y Gráfico 5.

Se valoró la edad de inicio de vida sexual activa, en aquellas que comenzaron de manera temprana es decir, menor de 18 años y aquellas que comenzaron después de los 18 años, sin notar una diferencia significativa entre ambos grupos y el riesgo para adquirir infección por VPH, calculando un riesgo estimado de 0.77 y un intervalo de confianza de 0.334 a 1.8 ($p=0.56$) Tabla 10, Gráfico 6.

Otra variable que se valoró fue el número de parejas sexuales, notando un riesgo estimado de 3.3 para infección de VPH en aquellas pacientes que tuvieron más de una pareja sexual, con un intervalo de confianza de 1.38 a 7.96, y una p significativa de 0.007. Tabla 11, Gráfico 7.

El uso de preservativo también se valoró, sin ver diferencias significativas entre aquellas pacientes que si lo utilizaban a comparación de aquellas en que no lo utilizaban, con un riesgo estimado de 1.04 para infección de VPH, y un intervalo de confianza de 0.44 a 2.44 ($p= 0.91$) Tabla 12, Gráfico 8.

La mayor parte de las pacientes a quienes se diagnóstico infección por el Virus del Papiloma Humano con PCR se encontraron al momento de la toma de la muestra en el tercer trimestre. Tabla 13, Gráfico 9.

El 42.2% de la población VPH positiva se notó que, el 69% de ellas se encuentra entre el rango de edades de 18 a 25 años. El 59.4% de las pacientes VPH positivas se encuentra en unión libre. Un 62.5% de las pacientes tienen tabaquismo negativo e inicio de vida sexual a los 18 años en un 31.25%. El 43.75% de éste grupo de pacientes positivas a VPH sólo tenían una pareja sexual y utilizaban el preservativo como método anticonceptivo en un 56.25%.

9. CONCLUSIONES

En el 90% de las muestras de citología cervical se obtuvo suficiente cantidad de ADN para su amplificación por PCR.

La prevalencia de positividad a VPH por PCR en el grupo de estudio fue del 38%.

El tipo viral de VPH más frecuente en nuestra población de estudio fue el 35 (16.6%), en segundo lugar el 68 (14.2%) y el tercero en frecuencia fue el 16 (11.9%). No se encontró ninguna muestra VPH positivo al tipo 18.

El porcentaje de tipos virales según grupo de riesgo carcinogénico fue en un 73.80% para VPH de Alto Riesgo, 14.28% para VPH de Bajo Riesgo, 7.14% VPH sin clasificar y 4.7% de VPH de Probable Alto Riesgo.

La prevalencia de VPH de Alto Riesgo en la población de estudio general fue de un 34.4%, observándose un 2.8% menos de la frecuencia encontrada de VPH de alto riesgo reportado en pacientes embarazadas - Hernández-Girón C y cols. (4)

Se analizaron las diferencias entre las características demográficas y los factores de riesgo para adquirir la infección por el virus del papiloma humano, sin encontrar diferencias significativas entre las variables excepto, el número de parejas sexuales donde, se observó un riesgo estimado de 3.3 en aquellas pacientes que tuvieron más de una pareja sexual en contra de aquellas que sólo tuvieron una pareja sexual.

10. PERSPECTIVAS

Estudios como éste nos permite conocer mejor sobre los factores epidemiológicos y etiológicos presentes en las displasias del aparato genital de la mujer mexicana, la demostración de la alta prevalencia del VPH con predominio de los tipos de alto riesgo nos deben hacer pensar sobre la importancia de los programas de vacunación y de detección oportuna a través del tamizaje global y universal que requiere la mujer en nuestro país.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997;102(5A):3-8.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Genital HPV infection Fact Sheet. Rockville, Md: CDC National Prevention Information Network; 2004. Available at: <http://www.cdc.gov/std/HPV/hpv.pdf>. Accessed September 21, 2004.
3. Muller Carolyn, Smith Harriet. Cervical Neoplasia Complicating Pregnancy. *Obstet Gynecol Clin N Am* 2005;32:533-46.
4. Hernandez-Girón C, Smith JS, Lorincz A, Lazcano E, Hernández-Avila M, Salmerón J. High-risk human papillomavirus detection and related risk factors among pregnant and nonpregnant women in Mexico. *Sex Trans Dis* 2005; 32:613-18.
5. Bonnez W. Papillomavirus. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FJ, eds. *Clinical Virology*. 2nd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press; 2002:557-596.
6. Molano M, van den Brule A, Plummer M, et al. Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: A population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol*. 2003;158:486-494.
7. Pinto AP, Crum CP. Natural history of cervical neoplasia: defining progression and its consequence. *Clin invasive cervical cancer worldwide. J Pathol*. 1999;189:12–19.
8. Hatch KD, Berek JS. Intraepithelial disease of the cervix, vagina, and vulva. In: Berek JS, ed. *Novak's and anal intraepithelial lesions and vulvar cancer. Obstet Gynecol*. 2006;108(6):1361–1368
9. Sellors JW, Sankaranarayanan R, eds. An introduction to cervical intraepithelial neoplasia (CIN). In: *Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Beginner's Manual*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2005:1–5. IARC Web site. <http://screening>.
10. Vaginal cancer: HPV and cofactors. *Gynecol Oncol*. 2002;84:263–270. Östör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol*. 1993;12(2):186–192.
11. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer A, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-9.
12. Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical cancer screening; a prospective study. *Lancet*. 1999;354:20-25.
13. American Cancer Society. Cervical cancer. What is cancer? Available at: <http://documents.cancer.org/115.00/115.00.pdf>. Accessed January 4, 2005.
14. Chao A, Lin C-T, Hsueh S, Chou H-H, Chang T-C, Chen M-Y, et al. Usefulness of human papillomavirus testing in the follow-up of patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia after conization. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:1046-51
15. World Health Organization. The current status of development of prophylactic vaccines against human papillomavirus infection. Report of a technical meeting, 16-18 February 1999. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1999:1-22.

16. Wiley DJ, Douglas J, Beutner K, et al. External genital warts: Diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Infect Dis.* 2002;35(suppl 2):S210-S224.
17. Kodner CM, Nasraty S. Management of genital warts. *Am Fam Physician.* 2004;70:2335-2342, 2345-2346.
18. Maw RD, Reitano M, Roy M. An international survey of patients with genital warts: Perceptions regarding treatment and impact on lifestyle. *Int J STD AIDS.* 1998;9:571-578.
19. Derkey CS, Darrow DH. Recurrent respiratory papillomatosis. *Ann Otolaryngol.* 2006;115(1):1-11.
20. Burk RD, Ho GY, Beardsley L: Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J. Infect.Dis.* 1996; 174 (4): 679-89.
21. Adam E, Berkova Z, Daxnerova Z, 2000: Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 182: 257-264
22. Burk RD, Kelly P, Feldman J, 1996: Declining presence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex. Transm. Dis.* 23: 333-341
23. Negrini BP, Schiffman MH, Kurgan RJ. 1990: Oral contraceptive use, human papillomavirus infection, and risk of early cytological abnormalities of the cervix. *Cancer Res.* 50 (15): 4670-5
24. Magnusson PKE, Lichtenstein P, Gyllenstein UB, 2000: Heritability of cervical tumors. *Int. J. Cancer,* 88: 698-701
25. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16(1): 1-17.
26. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases. Genital HPV infection CDC fact sheet. Sitio web de los CDC. <http://www.cdc.gov/std/HPV/STDFact-HPV.htm>.
27. Derkey CS, Darrow DH. Recurrent respiratory papillomatosis of the larynx. *Otolaryngol Clin North Am.* 2000; 33(5):1127-1141. [vaccines/human_papillomavirus/HPVg%20Final%20BS%202050%20.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/vaccines/human_papillomavirus/HPVg%20Final%20BS%202050%20.pdf). WHO/BS/06.2050—Final.
28. Winer RL, Lee S-K, Hughes JP, et cols. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol.* 2003;157(3):218–226. Saffar MJ, Rezai MS. Long-term antibody response and immunologic memory in children immunized
29. Roden RBS, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus is resistant to desiccation. *J Infect Dis.* 1997; 176:1076–1079. virus vaccination in Taiwan. *J Infect Dis.* 2003;187:134–138.
30. Schiffman M, Kjaer SK. Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 2003;31:14–19.
31. Jansen KU, Shaw AR. Human papillomavirus vaccines and prevention of cervical cancer. *Annu Rev Med.* 2004;55:319–331.
32. Wiley DJ, Douglas J, Beutner K, et al. External genital warts: Diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Infect Dis.* 2002;35(suppl 2):S210–S224.
33. Schiffman M, Castle PE. Human papillomavirus: Epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127:930–934.

34. Bosch FX, de Sanjosé S. Human papillomavirus and cervical cancer—Burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;31:3–13.
35. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348:518–527.
36. Syrjänen KJ, Syrjänen SM. Molecular biology of papillomaviruses. In: *Papillomavirus Infections in Human Pathology.* Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons, Inc.; 2000:11–51.
37. Shah KV. Papovaviruses. In: Rose NR, de Macario EC, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 5th ed. Washington, DC: ASM Press; 1997:655–660.
38. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine.* 2006;24 Suppl 1:S16–22.
39. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nature Rev Cancer.* 2002;2:342–350.
40. Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:46–54.
41. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005;32(suppl):S7–S15.
42. Association of Reproductive Health Professionals. ARHP clinical proceedings: HPV infection and cervical intraepithelial neoplasia. Available at: <http://www.arhp.org/healthcareproviders/cme/onlinecme/hpvcp/infection.cfm>. Accessed June 14, 2005.
43. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16:1–17.
44. Bonnez W. Papillomavirus. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FJ, eds. *Clinical Virology.* 2nd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press; 2002:569–612.
45. Hans-Ulrich B, 2005: The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J. of Clinical Virology* 32S. S1–S6
46. World Health Organization. Vaccines against human papillomavirus. World Health Organization; 2001. Available at: <http://www.who.int/vaccines/en/hpvrd/shtml>. Accessed July 12, 2004.
47. Sellors JW, Mahony JB, Kaczorowski J, et al. Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. *CMAJ.* 2000;163:503–508.
48. Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, et al. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer.* 2001;91:412–420.
49. Matos E, Loria D, Amestoy GM, et al. Prevalence of human papillomavirus infection among women in Concordia, Argentina: A population-based study. *Sex Transm Dis.* 2003;30:593–599.
50. Clavel C, Masure M, Bory JP, et al. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: A study of 7932 women. *Br J Cancer.* 2001;84:1616–1623.
51. Blumenthal PD, Gaffikin L, Chirenje ZM, McGrath J, Womack S, Shah K. Adjunctive testing for cervical cancer in low resource settings with visual inspection, HPV, and the Pap smear. *Int J Gynecol Obstet.* 2001;72:47–53.

52. Belinson J, Qiao YL, Pretorius R, et al. Shanxi Province Cervical Cancer Screening Study: A cross-sectional comparative trial of multiple techniques to detect cervical neoplasia. *Gynecol Oncol*. 2001;83:439–444.
53. Centers for Disease Control and Prevention. Genital HPV Infection Fact Sheet. Rockville, Md: CDC National Prevention Information Network; 2004.
54. Weinstock H, Berman S, Cates W Jr. Sexually transmitted diseases among American youth: Incidence and prevalence estimates, 2000. *Perspect Sex Reprod Health*. 2004;36:6–10.
55. Cates W Jr, and the American Social Health Association Panel. Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. *Sex Transm Dis*. 1999;26(suppl):S2–S7.
56. Jansen KU, Shaw AR. Human papillomavirus vaccines and prevention of cervical cancer. *Annu Rev Med*. 2004;55:319–331.
57. Insinga RP, Dasbach EJ, Myers ER. The health and economic burden of genital warts in a set of private health plans in the United States. *Clin Infect Dis*. 2003;36:1397–1403.
58. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med*. 1997;102:3–8.
59. Franco EL, Villa LL, Richardson H, Rohan TE, Ferenczy A. Epidemiology of cervical human papillomavirus infection. In: Franco EL, Monsonogo J, eds. *New Developments in Cervical Cancer Screening and Prevention*. Oxford, UK: Blackwell Science; 1997:14–22.
60. Tortolero-Luna G. Epidemiology of genital human papillomavirus. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1999;13:245–257.
61. Franco EL, Harper DM. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine*. 2005;23:2388–94.
62. World Health Organization. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2003:1–74.
63. American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures 2005*. Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2005:1–60.
64. Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin*. 2005;55:10–30.
65. Ault KA. Human papillomavirus infections: diagnosis, treatment, and hope for a vaccine. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2003;30:809–17.
66. Apgar Brotzman Spitzer. *Colposcopia Principios y práctica*. Mc Graw Hill. 2003:413–31.
67. Molijn, A., Kleter, B., Quint, W., Doorn, L.J. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* 2005; 32 (Suppl.):43–51.
68. Muñoz, N., Bosch, F.X., De Sanjosé, S. y cols. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518–527.
69. Leung, A.K., Kellner, J.D., Davies, H.D. Genital infection with human papillomavirus in adolescents. *Adv Ther* 2005; 22: 187–197.
70. Sellors JW, Mahony JB, Kaczorowski J, et al. Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. *CMAJ*. 2000;163:503–508.
71. Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, et al. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer*. 2001;91:412–420.

72. Matos E, Loria D, Amestoy GM, et al. Prevalence of human papillomavirus infection among women in Concordia, Argentina: A population-based study. *Sex Transm Dis.* 2003;30:593–599.
73. Clavel C, Masure M, Bory JP, et al. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: A study of 7932 women. *Br J Cancer.* 2001;84:1616–1623.
74. Blumenthal PD, Gaffikin L, Chirenje ZM, McGrath J, Womack S, Shah K. Adjunctive testing for cervical cancer in low resource settings with visual inspection, HPV, and the Pap smear. *Int J Gynecol Obstet.* 2001;72:47–53.
75. Belinson J, Qiao YL, Pretorius R, et al. Shanxi Province Cervical Cancer Screening Study: A cross-sectional comparative trial of multiple techniques to detect cervical neoplasia. *Gynecol Oncol.* 2001;83:439–444.
76. Iftner T, Villa LL. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:80-8.
77. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 199;189:12-9.
78. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:244-65.
79. Clavel C, Cucherousset J, Lorenzato M, Caudroy S, Nou JM, Nazeyrollas P, Polette M, Bory JP, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P. Negative human papillomavirus testing in normal smears selects a population at low risk for developing high-grade cervical lesions. *Br J Cancer* 2004;90:1803-8.
80. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348(6):518-27.
81. Castle PE, Wheeler CM, Solomon D, Schiffman M, Peyton CL; ALTS Group. Interlaboratory reliability of Hybrid Capture 2. *Am J Clin Pathol* 2004;122:238-45.
82. Kulmala SM, Syrjanen S, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Podistov J, Ivanchenko O, Zakharenko S, Nerovjna R, Kljukina L, Branovskaja M, Grunberga V, Juschenko A, Tosi P, Santopietro R, Syrjanen K. Human papillomavirus testing with the hybrid capture 2 assay and PCR as screening tools. *J Clin Microbiol* 2004;42:2470-5.
83. Hesselink AT, van den Brule AJ, Brink AA, Berkhof J, van Kemenade FJ, Verheijen RH, Snijders PJ. Comparison of hybrid capture 2 with in situ hybridization for the detection of high-risk human papillomavirus in liquid-based cervical samples. *Cancer* 2004;102:11-8.
84. Lorincz AT. Screening for cervical cancer: new alternatives and research. *Salud Publica Mex* 2003;45(Suppl 3):S376-87.
85. Bonnez W. Papillomavirus. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, eds. *Clinical Virology*. 2a. ed. Washington, DC: ASM Press; 2002:557–596.48
86. Pagliusi SR, Aguado MT. Efficacy and other milestones for human papillomavirus vaccine introduction. *Vaccine.* 2004;23:569–57

87. Zielinski GD, Bais AG, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, de Schipper FA, Snijders PJ, Voorhorst FJ, van Kemenade FJ, Rozendaal L, Meijer CJ. HPV testing and monitoring of women after treatment of CIN 3: review of the literature and meta-analysis. *Obstet Gynecol Surv* 2004;59:543-53.
88. Soares VR, Nieminen P, Aho M, Vesterinen E, Vahei A, Pavoneen J: HPV DNA in unselected pregnant and non pregnant. *Int J STD AIDS*. 1990;1(4):276-8.
89. Armbruster-Moraes E, Ioshimoto L, Leao E, Zugaib M. Prevalence of high-risk HPV in the lower genital tract of Brazilian gravidas. *Int J Gynaecol Obstet* 2000;69(3):223-27.
90. Hellman L, Prtichard J. *Fisiología del Embarazo en Williams Obstetricia*. México: Editorial Salvat, 1980.
91. Arena S, Marchoni M, Ubertosi M, Frega A, Arena G, Villani C: HPV and pregnancy: diagnosis, methods, transmission and evolution. *Minerva Ginecol* 2002;54(3):225-37.
92. Snijders, P.J., Van den Brule, A.J., Jacobs, M.V., Pol, R.P., Meijer, C.J. HPV DNA detection and typing in cervical scrapes. *Methods Mol Med* 2005; 119: 101-114.
93. Van Doorn, L.J., Quint, W., Kleter, B. y cols. Genotyping of human papillomavirus in liquid cytology cervical specimens by the PGMV Line blot assay and the SPF10 line probe assay. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 979-983.
94. Liu, C., Ma, W., Zhang, B., Shi, R., Zheng, W. Study on development of DNA microarrays for human papillomavirus (HPV) diagnosis. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 2003; 43: 613-618.
95. Burd, E.M. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 1-17.
96. Muñoz, N. Human papillomavirus and cancer: The epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000; 19: 1-5.
97. Editorial. High hopes and dilemmas for a cervical cancer vaccine. *Science* 2005; 308: 618-621.
98. Baseman, J.G., Koutsky, L.A. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005; 32 (Suppl.): 16-24.
99. Stern, P.L. Immune control of human papillomavirus (HPV) associated anogenital disease and potential for vaccination. *J Clin Virol* 2005; 32 (Suppl.): 72-81.
100. Villa, L.L., Costa, R.L.R., Petta, C.A. y cols. Vacuna de partículas de tipo viral L1 de papilomavirus humano tetravalente (tipos 6, 11, 16 y 18) profiláctica en mujeres jóvenes: Ensayo multicéntrico de eficacia de fase II, controlado con placebo, doble ciego y aleatorizado. *Lancet Oncology* 2005; 6: 271-278.

12. ANEXOS

12.1.- Anexo 1. Carta de Consentimiento Informado

Secretaría de Salud. Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

De acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y con La ley General de Salud, Título Segundo. De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos CAPITULO I Disposiciones Comunes. Artículo 13 y 14.- En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar. Debido a que esta investigación se consideró como riesgo mínimo o mayor de acuerdo al artículo 17 título 2do. Capítulo 4 de la investigación en mujeres embarazadas y en cumplimiento con los siguientes aspectos mencionados con el Artículo 21 y los artículos del 40 al 56:

- I. Se me ha explicado que durante mi embarazo se me propone participar en el proyecto para estudiar la detección de personas infectadas (enfermas) por el virus del papiloma humano.
- II. Se me ha informado que se tomará una muestra por frotis (rozar o frotar) el cuello de la matriz, ésta toma es adicional al estudio que requiere mi embarazo. Además se me interrogará sobre antecedentes personales médicos.
- III. Se me explicó que la toma de muestra del cuello de matriz con un citobrush (cepillo) puede dar como resultado escaso sangrado sin poner en riesgo al embarazo, ni al feto y que éstos se resolverán con las indicaciones del médico en término de menos de 12hrs
- IV. Los resultados de éste estudio ayudarán a determinar si padezco o no la infección por el virus del papiloma en mi caso y el de otras pacientes, que en cuyo caso si padezco la enfermedad será enviada al servicio de Displasias para mi seguimiento. Seré notificada del resultado vía telefónica.
- V. Se me ha asegurado que puedo preguntar hasta mi complacencia todo lo relacionado con el estudio y mi participación.
- VI. Se me aclaró que puedo abandonar el estudio en cuanto yo lo decida, sin que ello afecte mi atención por parte del médico o del hospital.
- VII. Autorizo la publicación de los resultados de mi estudio a condición de que en todo momento se mantendrá el secreto profesional y que no se publicará mi nombre o revelará mi identidad.
- VIII. El estudio de las muestras tomadas serán procesadas gratuitamente, se me aclaró también que, en caso de que presentara algún problema derivado de la toma de la muestra de este estudio el médico me garantiza la atención inmediata en el servicio de urgencias Obstétricas del hospital.

XI. Los estudios de laboratorio que se practicaran serán cubiertos por el laboratorio del Instituto Nacional de Cancerología.

Con fecha _____, habiendo comprendido lo anterior y una vez que se me aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a mi participación en el proyecto, acepto participar en el estudio titulado:

**DETECCIÓN Y PREVALENCIA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN
PACIENTES EMBARAZADAS DEL HOSPITAL GENERAL
DR. MANUEL GEA GONZALEZ, SSA.**

Nombre y firma del paciente o responsable legal

Nombre, y firma del testigo 1
Dirección
Relación que guarda con el paciente

Nombre, y firma del testigo 2
Dirección
Relación que guarda con el paciente

Nombre y firma del Investigador Responsable o Principal
Dra. Emma Elizabeth Marsal Martínez, teléfono: 044 5538857956

Este documento se extiende por duplicado, quedando un ejemplar en poder del sujeto de investigación o de su representante legal y el otro en poder del investigador. Queda entendido que la Dirección e Investigación o Los Comités de Ética y de Investigación podrán requerir este documento en cuanto lo consideren necesario, así como que este documento deberá ser conservado por el investigador responsable durante un mínimo de 5 años.

Para preguntas o comentarios comunicarse con el Dr. Alfonso Galván Montaña, presidente de las Comisiones de Ética y de Investigación al (01 55) 4000 3000.

12.2.- Anexo 2. Encuesta para recabar datos personales y gineco-obstétricos de pacientes a la toma de muestra.

**Hospital General Dr. Manuel Gea González
Encuesta Obstétrica**

Toda la información de ésta cédula es CONFIDENCIAL y para fines estadísticos.

Nombre : _____

Edad : _____

Domicilio particular : _____

Teléfono del domicilio o donde se le pueda localizar en caso necesario :

1.- Actualmente usted esta :

Soltera 1

Casada 2

En unión libre 3

Divorciada 4

Viuda 5

2.- Usted fuma o fumó ?

Sí 1

No..... 2

3.- Cuántos años tenía cuando usted tuvo su primera regla (menstruación) ?

Edad..... _____

4.- Qué edad tenía cuando tuvo relaciones sexuales por primera vez ?

Edad..... _____

5.- Cuántas parejas sexuales ha tenido en su vida ?

Una 1

Dos 2

Tres 3

De 4 a 6 4

De 7 a 10..... 5

Más de 11 6

6.- Usa o ha usado el preservativo (condón) para protegerse de enfermedades venéreas al tener relaciones sexuales ?

Sí 1

No 2

7.- Cuándo fue la fecha de su última regla (mestruación) ?

Fecha dd/mm/aa _____

8.- La edad de su embarazo en éste momento es ?

Primer trimestre (de las 2 a 12 semanas) 1

Segundo trimestre (de las 13 a las 24 semanas).... 2

Tercer trimestre (de las 25 a las 40 semanas) 3

12.3.- TABLAS DE RESULTADOS ANALIZADOS CON EL PROGRAMA SPSS

Tabaquismo * Resultado viral

Crosstab

Count

		Resultado viral		Total
		Positivo	Negativo	
Tabaquismo	Positivo	12	24	36
	Negativo	20	44	64
Total		32	68	100

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Tabaquismo (Positivo / Negativo)	1.100	.460	2.630
For cohort Resultado viral = Positivo	1.067	.593	1.920
For cohort Resultado viral = Negativo	.970	.730	1.288
N of Valid Cases	100		

Mantel-Haenszel Common Odds Ratio Estimate

Estimate		1.100
ln(Estimate)		.095
Std. Error of ln(Estimate)		.445
Asymp. Sig. (2-sided)		.830
Asymp. 95% Confidence Interval	Common Odds Ratio	Lower Bound
		Upper Bound
	ln(Common Odds Ratio)	Lower Bound
		Upper Bound
		.460
		2.630
		-.776
		.967

The Mantel-Haenszel common odds ratio estimate is asymptotically normally distributed under the common odds ratio of 1.000 assumption. So is the natural log of the estimate.

Riesgo IVSA * Resultado viral

Crosstab

Count

		Resultado viral		Total
		Positivo	Negativo	
Riesgo IVSA temprana	IVSA	14	34	48
	IVSA > 18a	18	34	52
Total		32	68	100

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Riesgo IVSA (IVSA temprana / IVSA > 18a)	.778	.334	1.810
For cohort Resultado viral = Positivo	.843	.473	1.502
For cohort Resultado viral = Negativo	1.083	.828	1.417
N of Valid Cases	100		

Mantel-Haenszel Common Odds Ratio Estimate

Estimate		.778
ln(Estimate)		-.251
Std. Error of ln(Estimate)		.431
Asymp. Sig. (2-sided)		.560
Asymp. 95% Confidence Interval	Common Odds Ratio	Lower Bound
		Upper Bound
	ln(Common Odds Ratio)	Lower Bound
		Upper Bound
		.334
		1.810
		-1.096
		.594

The Mantel-Haenszel common odds ratio estimate is asymptotically normally distributed under the common odds ratio of 1.000 assumption. So is the natural log of the estimate.

Numero de PS * Resultado viral

Crosstab

Count

		Resultado viral		Total
		Positivo	Negativo	
Numero de PS	Más de una	18	19	37
	Solo una pareja	14	49	63
Total		32	68	100

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Numero de PS (Más de una / Solo una pareja)	3.316	1.380	7.967
For cohort Resultado viral = Positivo	2.189	1.240	3.865
For cohort Resultado viral = Negativo	.660	.470	.928
N of Valid Cases	100		

Mantel-Haenszel Common Odds Ratio Estimate

Estimate			3.316
ln(Estimate)			1.199
Std. Error of ln(Estimate)			.447
Asymp. Sig. (2-sided)			.007
Asymp. 95% Confidence Interval	Common Odds Ratio	Lower Bound	1.380
		Upper Bound	7.967
	ln(Common Odds Ratio)	Lower Bound	.322
		Upper Bound	2.075

The Mantel-Haenszel common odds ratio estimate is asymptotically normally distributed under the common odds ratio of 1.000 assumption. So is the natural log of the estimate.

Uso de preservativo * Resultado viral

Crosstab

Count		Resultado viral		Total
		Positivo	Negativo	
Uso de preservativo	No utiliza	14	29	43
	Si utiliza	18	39	57
Total		32	68	100

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Uso de preservativo (No utiliza / Si utiliza)	1.046	.448	2.442
For cohort Resultado viral = Positivo	1.031	.580	1.833

For cohort Resultado viral = Negativo	.986	.751	1.294
N of Valid Cases	100		

Mantel-Haenszel Common Odds Ratio Estimate

Estimate			1.046
ln(Estimate)			.045
Std. Error of ln(Estimate)			.433
Asymp. Sig. (2-sided)			.917
Asymp. 95% Confidence Interval	Common Odds Ratio	Lower Bound	.448
		Upper Bound	2.442
	In(Common Odds Ratio)	Lower Bound	-.803
		Upper Bound	.893

The Mantel-Haenszel common odds ratio estimate is asymptotically normally distributed under the common odds ratio of 1.000 assumption. So is the natural log of the estimate.

Trimestre de embarazo * Resultado viral Crosstabulation

Count

		Resultado viral		Total
		Positivo	Negativo	
Trimestre de embarazo	Primer trimestre	2	11	13
	segundo trimestre	13	12	25
	Tercer trimestre	17	45	62
Total		32	68	100

Report

Resultado viral		Edad en Años	Edad de Menarca	Parejas sexuales
Positivo	Mean	23.00	12.78	1.88
	N	32	32	32
	Std. Deviation	4.792	1.408	.942
Negativo	Mean	23.49	12.66	1.37
	N	68	68	68
	Std. Deviation	5.732	1.636	.689
Total	Mean	23.33	12.70	1.53
	N	100	100	100
	Std. Deviation	5.429	1.560	.810

Serotipo 1

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	16	5	5.0	15.6	15.6
	31	1	1.0	3.1	18.8
	35	4	4.0	12.5	31.3
	39	2	2.0	6.3	37.5
	45	2	2.0	6.3	43.8
	51	3	3.0	9.4	53.1
	53	2	2.0	6.3	59.4
	56	1	1.0	3.1	62.5
	58	2	2.0	6.3	68.8
	59	1	1.0	3.1	71.9
	61	2	2.0	6.3	78.1
	68	3	3.0	9.4	87.5
	70	1	1.0	3.1	90.6
	89	2	2.0	6.3	96.9
	90	1	1.0	3.1	100.0
	Total	32	32.0	100.0	
Missing	System	68	68.0		
Total		100	100.0		

Frequencies

Notes

Output Created		20-JUL-2009 10:06:46
Comments		
Input	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	100
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data.
Syntax		FREQUENCIES VARIABLES=Tipificación Tipificación2 /ORDER= ANALYSIS .
Resources	Elapsed Time	0:00:00.01
	Total Values Allowed	149796

Statistics

		Serotipo 1	Serotipo 2
N	Valid	32	11
	Missing	68	89

Frequency Table

Serotipo 1

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	16	5	5.0	15.6	15.6
	31	1	1.0	3.1	18.8
	35	4	4.0	12.5	31.3
	39	2	2.0	6.3	37.5
	45	2	2.0	6.3	43.8
	51	3	3.0	9.4	53.1
	53	2	2.0	6.3	59.4
	56	1	1.0	3.1	62.5
	58	2	2.0	6.3	68.8
	59	1	1.0	3.1	71.9
	61	2	2.0	6.3	78.1
	68	3	3.0	9.4	87.5
	70	1	1.0	3.1	90.6
	89	2	2.0	6.3	96.9
	90	1	1.0	3.1	100.0
	Total	32	32.0	100.0	
Missing	System	68	68.0		
Total		100	100.0		

Serotipo 2

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	35	4	4.0	36.4	36.4
	43	2	2.0	18.2	54.5
	56	1	1.0	9.1	63.6
	68	3	3.0	27.3	90.9
	70	1	1.0	9.1	100.0
	Total	11	11.0	100.0	
Missing	System	89	89.0		
Total		100	100.0		

Case Processing Summary

	Valid		Cases Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Primer B-Globina * Resultado viral	85	85.0%	15	15.0%	100	100.0%
Primer MY * Resultado viral	100	100.0%	0	.0%	100	100.0%
Primer LC * Resultado viral	100	100.0%	0	.0%	100	100.0%

Primer B-Globina * Resultado viral Crosstabulation

Count

		Resultado viral		Total
		Positivo	Negativo	
Primer B-Globina	B-Globina (+)	18	53	71
	B-Globina (-)	1	13	14
Total		19	66	85

Count

		Resultado viral		Total
		Positivo	Negativo	
Primer LC	LC (+)	20	2	22
	LC (-)	12	66	78
Total		32	68	100

Abreviaturas

VPH	Virus del papiloma humano
ADN	Acido desoxirribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
L1	Proteína recombinante de la cápside mayor
L2	Proteína recombinante de la cápside menor
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CIN / NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
PRR	Papilomatosis respiratoria recurrente
CaCu	Cáncer cervicouterino
LCR	Región larga de control
HSV	Herpes simple virus
CMV	Citomegalovirus
HHV-6	Herpesvirus humano tipos 6 y 7
ORF's	Marcos de lectura abiertos
E1, E2, E4, E5, E6 Y E7	Proteínas virales
APC	Células presentadoras de antígenos intraepiteliales
pRb	Proteína retinoblastoma
E2F	Factor de transcripción
ARN	Acido ribonucleico
EGF	Factor de crecimiento epidermal
VP's	Virus del papiloma
GLOBOCAN	Cancer Incidence and Mortality Worldwide
IARC	International Agency for Research in Cancer
LEEP	Escisión electroquirúrgica con asa
MDS	Merck Sharp & Dohme
VLP	Partículas semejantes a virus
Tm	Temperatura de alineamiento
HGDMGG	Hospital General Dr. Manuel Gea González
μl	Microlitro