



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA

T E S I S:

**“GENOTIPIFICACIÓN DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN
PACIENTES CON INFECCIÓN SUGESTIVA DE VPH DEL
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA”**

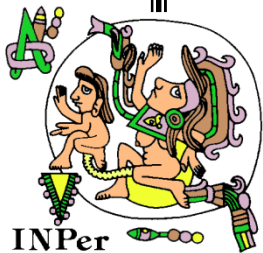
**Que para obtener el título de la
ESPECIALIDAD EN INFECTOLOGÍA**

P R E S E N T A

RAQUEL DEL SOCORRO ACEVEDO PÉREZ

**ASESOR DE TESIS:
M. en C. SAÚL FLORES MEDINA**

**COAUTORES:
DR. RICARDO FIGUEROA DAMIAN
QBP. CARMEN SELENE GARCÍA ROMERO
M. en C. DIANA MERCEDES SORIANO BECERRIL**



México, D.F. Julio de 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AUTORIZACION DE TESIS

DR.Carlos Ramirez Isarraraz

Subdirector Académico y de Gestión Educativa

Dr. Enrique Segur Cervantes

Profesor Titular del Curso de Especialidad en Infectología

M. en C Saúl Flores Medina

Asesor de Tesis

Dr. Ricardo Figueroa Damián

Asesor Metodológico

Índice

Marco Teórico.....	1
Planteamiento del problema.....	15
Justificación.....	16
Pregunta de investigación.....	17
Objetivo General.....	17
Objetivos específicos.....	17
Hipótesis.....	18
Tipo de estudio.....	19
Población de estudio.....	19
Criterios de inclusión.....	19
Criterios de exclusión.....	19
Variables independientes.....	19
Variables dependientes.....	19
Metodología.....	20
Resultados.....	23
Discusión.....	43
Conclusión.....	45

MARCO TEÓRICO

Los virus del género Papillomavirus, entre los que se incluyen, entre otros, los virus del papiloma humano (VPH), son virus de doble cadena de ADN sin envoltura y con una cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros que envuelven al genoma. Los viriones contienen al menos 2 proteínas de la cápside la proteína mayor L1 y la menor L2. El genoma está dividido en regiones, una de ellas es la región reguladora inicial no codificada (URR) o unidad larga de control (LCR), la cual es esencial para funciones reguladoras del genoma en la replicación del ADN y potenciadora de la transcripción viral. El resto del genoma se agrupa en zonas de lectura abierta (ORF) que se clasifican en dos regiones las de expresión temprana llamadas E (E1-E7) y tardía L (L1-L2).^(1, 2, 3)

La infección por VPH es trascendental desde el punto de vista de salud pública, por el potencial oncogénico de algunos genotipos; en las mujeres puede infectar cérvix, vagina, vulva y región perianal. Se han identificado cerca de 100 genotipos de VPH, algunos de ellos se han relacionado con lesiones genitales intraepiteliales e invasoras. De la misma manera, parecen desempeñar un papel importante en la génesis de la neoplasia intracervical (NIC), la cual se localiza habitualmente en la zona de transformación, es decir en el área de unión del epitelio escamoso ectocervical y el epitelio cilíndrico endocervical.^(2, 3)

Las regiones E o de expresión temprana codifican las proteínas responsables de las funciones de transformación celular, replicación y de la persistencia del ADN integrado en las células a las que infecta. Destacan las proteínas E1 que intervienen en la replicación viral; E2 que es un modulador de la transcripción viral, E4 que también parece desempeñar un papel en la replicación viral. Otras proteínas son E5, E6 y E7 que tienen un importante papel en los mecanismos de transformación celular. E6 facilita la degradación de las proteínas supresoras de tumores p53 y Rb 105 que inactivan su función, mecanismo que explica en parte la intervención de los VPH en el proceso de oncogénesis.^(3, 4, 5)

Las regiones tardías L están formadas por 2 secuencias L1 y L2, las cuales son responsables de la codificación de las proteínas de la cápside en la fase final de ensamblaje viral, la L1 codifica para la proteína principal de la cápside y la L2 para proteínas secundarias antígeno-específicas.^(1,3,4)

La clasificación de los genotipos se basa en la comparación de la secuencia de ADN de las regiones E6, E7 y L1. Los datos acumulados sugieren la posible asociación del VPH con un amplio espectro de tumores. A nivel genital se pueden clasificar en 3 grupos:

- a) Los asociados con lesiones benignas o de bajo riesgo (6,11, 30, 34, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 57, 61, 66, 70, 72, 81, CP6108), que producen lesiones escamosas intraepiteliales, con condilomas acuminados y lesión intraepitelial de bajo grado (LIEBG).
- b) El grupo de riesgo intermedio (31, 33, 35, 39, 51, 52)

- c) Los de alto riesgo oncogénico (16,18, 45, 46, 56, 58, 68, 73, 83) que abarcan todos los carcinomas intraepiteliales e invasores, tanto del epitelio escamoso como del glandular.

Los tipos 16 y 18 se han encontrado aproximadamente en el 50-70% de los carcinomas. El VPH 16 se asocia a lesiones del epitelio escamoso al igual que los genotipos 31, 33, 35, 52, 58 y 67. El VPH 18 es encontrado con más frecuencia en las neoplasias glandulares y el cáncer neuroendocrino de células pequeñas; al igual que los tipos 39, 45, 59 y 68. Los VPH de alto riesgo se han identificado en un 90 a 95% en lesiones invasivas del cérvix. Mientras que a nivel vulvar y vaginal se relaciona con los genotipos 11 y 17. ^(1, 5, 6, 7)

Ver tabla 1, ubicada en la sección VPH y cáncer.

Las infecciones por VPH de bajo y alto riesgo se presentan generalmente entre mujeres de 15 y 35 años, el 80% son transitorias siendo los tipos virales de alto riesgo las que progresen a un carcinoma invasivo. Dentro de los factores de riesgo asociados a esta infección se incluyen: Inicio precoz de actividad sexual, múltiples parejas sexuales, uso de anticonceptivos orales, tabaquismo, inmunocompromiso celular, promiscuidad relaciones sexuales sin preservativo, edad y presencia de otras enfermedades de transmisión sexual. ⁽⁷⁾

EPIDEMIOLOGÍA

La epidemiología de las infecciones del VPH no se conoce con precisión ya que las técnicas para la investigación seroepidemiológica son insuficientes y el diagnóstico de las infecciones no genitales se realiza en base al examen físico y posteriormente al examen histológico. La condición de una infección latente asintomática o sin evidencia histológica no favorece un dato real de infección por el virus ya que sólo puede ser diagnosticada por técnicas moleculares que no son rutinariamente utilizadas. Sin embargo, los VPH están distribuidos en toda la población y algunos de ellos están asociados con procesos malignos del tracto genital. ⁽⁷⁾

Se estima que a nivel mundial se presenta una incidencia anual de 6 millones de infecciones nuevas con VPH y por lo tanto representa una de las principales infecciones de transmisión sexual. En el 2002 la OMS publicó que entre el 65% al 70% de la población sexualmente activa a estado en contacto con algún genotipo del VPH sin que todos desarrollen la infección. En relación a infecciones subclínicas puede ser de hasta un 40% de la población femenina con tasas de infección de un 10 al 15%, el tumor más frecuente es el de cérvix (11.6%), seguido de vagina y vulva 3.7%. En mujeres mayores de 30 años la prevalencia se reduce a un 5 a 10 %, por otro lado la prevalencia de condiloma acuminado y de LIEBG es de 1.2 % de la población, mientras que alrededor de 500,000 nuevos casos de cáncer cervical son detectados anualmente, por lo que se puede decir que el

riesgo relativo de la asociación entre infección por VPH y neoplasia cervicouterina oscila en un rango del 20 al 70%.^(7, 8, 9)

La prevalencia de infección por VPH alrededor del mundo en mujeres va de un 2% a un 44%, siendo más alta entre mujeres jóvenes, decayendo conforme la edad aumenta. Además, la incidencia de infección con tipos virales oncogénicos parece ser más alta que aquella con tipos virales no oncogénicos.^(2, 3, 4, 9) De las mujeres infectadas con VPH el 25% desarrollan una LIEBG y solo el 2% de estas progresarán a lesiones intraepiteliales de alto grado (LIEAG). Esto significa que aquellas mujeres que en alguna ocasión adquirieron un VPH, sólo el 5 o 10% de ellas desarrollarán cáncer cervicouterino.^(2,10)

En los Estados Unidos la incidencia estimada de carcinoma in situ es de 55 casos por 100,000 mujeres al año y la de carcinoma invasor se estima 15 casos nuevos por 100,000 mujeres al año, calculándose una incidencia de 1-3 millones de personas con condilomas acuminados. En la población española se reporta 2.5% de cáncer cervicouterino (CaCu). En Europa las cifras correspondientes son 155 millones en mujeres mayores de 15 años, 15.5 millones de mujeres portadoras, 1.5 millones con lesiones de bajo grado, 85,000 mujeres con lesiones de alto grado y 23,000 casos de carcinoma invasor, El Instituto Nacional de Estadísticas en España contemplaba de 1993 a 1996 una incidencia para cáncer de 1,408 casos por 100,000 habitantes. El Colegio Americano de Patología estimaba en el 2006 cerca de 1 millón de mujeres al año diagnosticadas con NIC I y 500,000 con CaCu, tomando en cuenta la proporción de 1000 mujeres ellos aportan la siguiente frecuencia 1.2% NIC I, 1.5% NIC II y III.^(11, 12,13)

En México es la primera neoplasia genital mas importante y la primera causa de mortalidad en la población femenina, representa el 35% de los tumores malignos, siendo los 45 años la edad promedio de diagnostico, con una incidencia de 48 casos por 100 000 habitantes, en las mujeres embarazadas existe un 37.1% de riesgo de detectar VPH pudiéndose relacionar como factor de riesgo la inmunosupresión del embarazo como lo describe Hernández y col.⁽¹⁴⁾, otro estudio realizado por Bosch y col.⁽¹⁵⁾ reportan que el riesgo de enfermedad para CaCu se incrementó hasta 7 veces en mujeres con VPH 16 y 18. El VPH 16 estuvo presente en un 48% y el VPH 18 en un 6.7% en pacientes con CaCu y en las lesiones intraepiteliales (LEI) cervicales, observándose una prevalencia en este estudio de 7.24% y 11.35%. Montoya y col.⁽¹³⁾ detectaron VPH tipos 16, 18, 35 y 58 en CaCu y lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado en mujeres del occidente de México mediante tipificación de ADN por PCR. Bosch en un estudio mundial de VPH en varios países de Latinoamérica (sin incluir a México) describió frecuencia de ADN que van de 87% a 94.7% para cualquier VPH. En particular el VPH genotipo 16 se detectó de 34.7% a 59.6% y el VPH genotipo 18 se detectó de 4.1% a 15.1%⁽¹¹⁾. En un estudio realizado en México y Monterrey se utilizó la técnica de hibridación tipo Southern con un número de pacientes 23 y 14 respectivamente en los cuales se reporte la presencia de VPH 16 en 29% y 26% y VPH 18 en 7% y 10% respectivamente⁽¹³⁾, Estudios realizados en México que incluyeron 60 pacientes con NIC que emplean la PCR

determinaron frecuencias de 48.8% y 6.7% para VPH 16 y 18 respectivamente. ⁽¹³⁾ Toroella y col. ⁽¹⁶⁾ describieron la prevalencia para diferentes tipos de VPH en mujeres mexicanas con cuello uterino neoplásico y normal, estas fueron de 87% en CaCu y 83% para cualquier tipo de lesiones escamosas intraepiteliales. En México se estima una tasa de mortalidad por CaCu de 5.2 a 12.4 por 100,000 habitantes en América Latina siendo la mayor incidencia de cáncer in situ entre los 30 y 39 años, los de tipo invasor se encuentran en la sexta década de la vida, los estados de mayor prevalencia son: Morelos 11.35%, Oaxaca 10.02% Querétaro 9.6%, Estado de México 9.3% Distrito Federal 8.84%, Jalisco 7.24% y Michoacán 6.93%. ^(16,17).

Por lo anterior podemos decir que el cáncer de cérvix constituye un rubro importante en salud pública, aproximadamente el 80% se localiza en países en vías de desarrollo, en la mujer latinoamericana en edad reproductiva ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad por lo que es un problema grave de salud. La población hispana que radica en el sur de Estados Unidos y de Centroamérica ha incrementado hasta 3 veces la incidencia de mortalidad de CaCu, las bajas coberturas de tamizaje del CaCu entre la población latinoamericana con nivel socioeconómico bajo, la desnutrición y la falta de educación sexual a los grupos de alto riesgo, son las principales causas de falla para mejorar la supervivencia. ^(18,19, 20)

En un estudio realizado por Sánchez y col. ⁽⁹⁾ refieren que el VPH en la población mexicana es de un 14.5%, en los grupos de riesgo un 43% relacionado a las trabajadoras sexuales y 69% en mujeres positivas a VIH, el riesgo de infección se ha asociado con el aumento en el número de parejas sexuales en diferentes periodos de tiempo, en este estudio las mujeres utilizaron anticonceptivos orales o espermicidas lo cual se ha relacionado con presencia de VPH, del mismo modo el riesgo de la primera gesta antes de los 16 años y la multiparidad aumenta el riesgo de displasia como para cáncer cervical, ^(9,17,20)

El consenso multidisciplinario del foro de VPH sugiere que la prevalencia de las infecciones subclínicas por VPH puede ser de hasta un 40% con tasas de infección de un 10-15% anual, en los grupos de más de 30 años la prevalencia se reduce a un 5-10%, una aproximación de la prevalencia de VPH es el 10% en los países desarrollados y del 15% en los países en vías de desarrollo. La prevalencia de los condilomas acuminados y lesiones de bajo grado podrían ser del 1-2% en países desarrollados y del 1.5% al 3% en países en vías de desarrollo, la incidencia de carcinoma invasor en países en desarrollo se estima de 22.5 casos por 100 000 mujeres al año, Por último la supervivencia media de los casos de carcinoma invasor es de 10 años en los países desarrollados y de 5 en los países en vías de desarrollo. Actualmente se revisa la evidencia epidemiológica que relaciona al VPH con el cáncer de cérvix. El tipo viral más frecuentemente implicado en lesiones de tipo carcinoma es el genotipo 16 que representa un 50%, seguido por el VPH 18 con un 12%, el genotipo 45 en un 8% y el genotipo 31 en un 5%. ^(10, 11,21, 22)

PATOGENIA.

El VPH afecta piel y mucosas, el aspecto histológico varía según la localización de la infección y el tipo de virus. Se establece un periodo de incubación entre 6 semanas y 2 años, donde la célula diana es el queratinocito, iniciándose el ciclo celular cuando el virus se une a su célula blanco a través de un receptor de membrana la molécula A6- integrina. Una vez ocurrida la infección del virus se establece en el núcleo de las células basales fuera de los cromosomas del hospedero. A medida que las células se diferencian y desplazan hacia la superficie del epitelio, inician la replicación en coordinación con la división celular, conforme van migrando hacia el estrato espinoso del epitelio, la replicación viral se estimula, produciendo la acumulación de viriones dentro del núcleo. Suele haber integración en la región E1 y E2 del genoma, la división del gen E2 produce su inactivación con la consecuente pérdida de la función lo que permite la activación de los productos E6 y E7. ⁽¹⁾

Las regiones E6 y E7 son esenciales para los procesos de oncogénesis, ya que ellas producen las proteínas necesarias para la transformación, el E6 se une al gen supresor de tumores p53 y el E7 se une a otro gen supresor de tumores el producto del retinoblastoma y les impide actuar de forma normal. La proteína p53 es un importante regulador de la replicación celular y es conocido como el principal represor de tumores en el ser humano, es capaz de detectar daño sufrido por el ADN en cualquier célula del organismo. Si el daño ha sido en una etapa del ciclo celular en la que aun no ha ocurrido la replicación del ADN, p53 envía una señal para que el ciclo celular se pare y el daño celular sea reparado, cuando el daño es después de la replicación de ADN, p53 envía una señal para detener el ciclo celular y como a este nivel es imposible reparar los daños la célula sufre un proceso de apoptosis, con esto no se permite que los daños causados al ADN sean heredados a celular hijas que pueden ser el origen de un tumor maligno. ⁽⁸⁾

La proteína E7 se une al producto del gen supresor de retinoblastoma, el cual es un factor regulador del ciclo celular ya que se une directamente al factor transcripcional E2F, que a su vez induce la transcripción de elementos involucrados con la replicación celular, la proteína E7 de los VPH de alto riesgo tienen una alta afinidad por el sitio de unión de retinoblastoma a E2F, cuando la célula ha sido infectada se unen a este sitio impidiendo que éste mantenga controlado a E2F, el cual queda libre e induce la replicación celular continua. De esta manera E6 y E7 cooperan eficientemente en la transformación de las células produciendo tumores cervicales a largo plazo. ⁽¹⁶⁾

La expresión de los genes tempranos ocurre a lo largo de todos los estratos epiteliales, la expresión de los genes tardíos se observa únicamente en los queratinocitos totalmente diferenciados de los estratos córneos, los VPH no presentan un fase lítica por lo que se valen de las características propias de las células que los albergan para propagar su progenie, la cual es liberada cuando las células terminales del estrato córneo sufren un proceso de descamación. ^(6,16)

En las lesiones benignas el ADN se localiza en posición extra cromosómica del núcleo celular, por el contrario en las lesiones grave, el ADN se encuentra integrado en el cromosoma celular, el ADN viral se inserta rompiendo la región E2, esta circunstancia puede explicar la malignización de la lesión ya que la expresión de la proteína E2 regula la expresión de las proteínas supresoras de tumores que son p53 y el oncogén del retinoblastoma. Otros mecanismos de patogenicidad oncológica son la inestabilidad cromosómica, la colaboración de oncogenes activados, la metilación de distintas zonas del ADN viral y celular y diversos factores hormonales e inmunogenéticos. ^(1,8)

En los pacientes con VPH se han descrito diversas alteraciones inespecíficas del sistema inmunitario entre ellos la disminución del factor de necrosis tumoral alfa, interleucina 1 y los interferones, las que normalmente contribuyen al control de las infecciones. Las reacciones de hipersensibilidad retardada y las respuestas linfoproliferativas y citotóxicas frente los antígenos de VPH especialmente E6 y E7, son frecuentes en los pacientes infectados pero no se detectan en todos ellos. ⁽⁸⁾

MANIFESTACIONES CLINICAS:

Verrugas anogenitales:

Son pápulas cutáneas exofíticas, hiperqueratósicas de aspecto carnosos y coloración grisácea con un pedículo corto y ancho o múltiples con bordes bien delimitados, La incidencia se presenta más entre mujeres de 20 a 24 años se reportan 1200 casos x 100 000 pacientes, el aspecto va desde un color aperlado y liso, su tamaño es desde 1 mm, en las mujeres las lesiones aparecen en el introito vaginal , vulva, periné, ano, cuello uterino y con menor frecuencia en los labios mayores y clítoris, las verrugas causadas por los tipos 16 y 18 son lesiones pequeñas, blanquecinas con bordes mal definidos. ^(12,21, 23)

Condilomas acuminados:

También conocidos como verrugas genitales, se caracterizan por la presencia de excrecencias carnosas localizadas en las mucosas del área ano genital, suelen ser de aspecto exofítico generalmente pediculado y papulares en ocasiones aplanados, se presentan bajo el aspecto de una lesión hiperplásica carnosos y húmeda de color rosa o blanca o bien se pueden presentar como lesiones hiperqueratósicas o pápulas pigmentadas, que tienen forma semejante a una coliflor. En su evolución pueden permanecer indefinidamente con las características ya mencionadas, involucionar o extenderse de forma progresiva. En este último caso pueden formar placas infiltradas y de aspecto tumoral .El segundo aspecto clínico es su presentación en pequeñas pápulas, múltiples. Suelen ser induradas al tacto y se localizan en los límites de la mucosa de la piel. ^(19, 24, 25)

En la mujer aparecen en la horquilla vulvar y en labios mayores y menores, por las condiciones de humedad del área genital pueden propagarse a toda la vulva, incluso al perineo y área perianal. En la vulva y perineo pueden manifestarse como condilomas exofíticos o como lesiones de tipo papuloso, micropapular o macular, redondeadas, levemente sobreelevadas, estos suelen ser benignos pero pueden contener 5% de virus oncogénicos. ^(24, 25,26)

Las lesiones subclínicas en la mujer se localizan en la mayoría en las superficies de las mucosas y se manifiestan por manchas de color blanco y lesiones aplanadas y múltiples. Microscópicamente se caracterizan por un epitelio escamoso acantótico y algunas veces hiperqueratótico, se observan múltiples capilares en las formaciones papilomatosas, coilocitos con halos citoplasmáticos, multinucleados, con cromatina con aspecto de vidrio esmerilado. La actividad mitótica en la capa basal y media, produce muchas veces lesiones subclínicas que se hacen evidentes al examen colposcópico tras la aplicación de ácido acético al 5%. ^(12,26)

Cáncer y VPH

Actualmente hay mas de 100 genotipos de VPH, algunos de ellos los considerados como de alto riesgo afectan al epitelio escamoso y estratificado por lo que se han asociado al 99% de los CaCu. Los genotipos de bajo riesgo se relacionan a lesiones benignas como condilomas y NIC menores. ⁽²⁷⁾

Tabla 1. Asociación entre genotipo aislado y lesión observada.

Lesión	Genotipos
Verrugas cutáneas	1,2,3,4,7,10,13,28,29,38
Condiloma acuminado	6, 11
Neoplasia intraepitelial cervical	6,11,16,18,30,31,33,35,39,40,42,45,51,52,56
Carcinoma escamocelular de cérvix	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56
Adenocarcinoma de cérvix	18
Carcinomas y neoplasias intraepiteliales vulvares	16, raro 6 y 11
Carcinomas y neoplasias intraepiteliales anales	6, 16,11,18,33

Actualmente la infección por VPH se reconoce como la causa más importante del cáncer del cuello uterino, los genotipos que se clasifican como de bajo riesgo raramente conllevan a la aparición de cáncer, los más comunes incluyen a VPH 6 y 11. Los genotipos de alto riesgo más frecuentemente identificados son VPH 16,

18, 31 y 45, el lapso para que progresan a cáncer es de 10 a 20 años, los estudios sugieren que el que una mujer desarrolle cáncer o no, depende de una variedad de factores que actúan conjuntamente con los tipos de VPH asociados al mismo. Las lesiones intraepiteliales incluyen: Los de bajo grado NIC I o displasia leve, NIC II (displasia moderada) y NIC III (displasia grave y carcinoma in situ). Las lesiones NIC I y II son autolimitables, las NIC III tienen una historia natural distinta, las LIEAG incluyen las llamadas neoplasias cervicales intraepiteliales. ^(22, 24,28)

El CaCu es un problema de salud pública, la mortalidad es alta en América Latina y se asocia este problema al VPH en un 90%, la infección por el virus precede en el tiempo a la aparición de la neoplasia intraepitelial cervical, se considera al epitelio escamoso como el área más vulnerable a la infección, la asociación entre VPH y cáncer se sugirió por primera vez en la década de los 70 s, desde entonces se han desarrollado numerosos estudios que muestran una evidencia poderosa sobre el papel etiológico, usando métodos de hibridación se han descubierto secuencias de nucleótidos del VPH del 10 al 30% y estudios de PCR hallan una prevalencia del 46%, en las LEI se ha encontrado genoma viral en cérvix en 29-75% de casos de LEIAG 99% de los carcinomas escamocelulares, 90% en los adenocarcinomas invasivos de cérvix. Algunos genotipos de VPH poseen la capacidad de actuar en la transformación maligna ya que requieren ciertos eventos genéticos para que requiera esta transformación, en estudios se menciona que el 30% de las mujeres VPH 16 positivas desarrollan LIEAG y se relaciona a carcinoma escamocelular queratinizante, El VPH 18 se encuentra en adenocarcinomas, carcinomas adenocamosos y carcinomas de células pequeñas. A nivel vulvar las lesiones condilomatosas contienen VPH 6 y 11, el carcinoma in situ contiene VPH 16 en 60 a 90% de los casos. Los carcinomas de vulva son minoría y se relacionan con carcinomas verrucosos. ^(22,24)

El CaCu es más común después de los 35 años, lo que sugiere infección a temprana edad y progresión lenta a cáncer. Entre los factores predisponentes se ha identificado; el uso prolongado de anticonceptivos orales, coinfección con otros virus en cérvix, como el del herpes simple (HSV) tipo 2, citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano tipos 6 y 7 (HHV-6 y HHV-7). La carga viral de VPH correlaciona directamente con la severidad de la enfermedad, el VPH 16 puede alcanzar una carga viral más alta que otros tipos virales y representa el 27% del efecto de los factores subyacentes para el desarrollo del tumor. El CaCu de células escamosas es el más común, mientras que el 10 % de los casos son de origen glandular, es decir adenocarcinoma. El adenocarcinoma invasor puede ser puro o mezclado con carcinoma de células escamosas, con lo que se denomina carcinoma adenoescamoso. ^(7, 9,11)

Mucho se ha hecho énfasis en que la evolución a malignidad de los epitelios infectados con VPH depende de la asociación de varios factores y no sólo de la presencia de genotipos oncogénicos entre los cofactores necesarios para favorecer la progresión a malignidad del epitelio afectado, se mencionan:

Factores de adquisición:

Como la conducta sexual de riesgo (edad de primer coito, relaciones sexuales sin preservativo, promiscuidad, varones no circuncidados, malos hábitos higiénicos).

Factores de progresión/ regresión.

Virales: genotipos, integración al ADN viral y la carga viral.

Genéticos: respuesta inmunitaria y susceptibilidad genética.

Medio ambientales: edad, tabaco, uso de anticonceptivos orales, paridad, estado de inmunosupresión, VIH, enfermedades de transmisión sexual como Chlamydia y Herpes virus.

Factores de invasión:

Factores angiogénicos:

-alteración en la regulación negativa de proteínas inhibitorias endógenas como trombospondina-1 e factor de necrosis tumoral alfa.

-aumento en la función de factores de crecimiento. IL-8, TGFB, bFGF y el factor de crecimiento de endotelio vascular. ⁽⁷⁾

Para hablar de cáncer habrá que definir a la transformación confinada al espesor del epitelio, en 1949 Papanicolau introduce los términos de displasia en histopatología para designar dichos cambios, estableciendo una clasificación de leve, moderada y severa o grave. Sin embargo es hasta 1967 cuando se propone el término de neoplasia intraepitelial cervical (NIC), agrupándose en 3 grados, la ventaja principal es el reconocimiento de la unidad del proceso patológico lo cual conlleva a una relación con las técnicas terapéuticas. Esta clasificación ha sido bastante adecuada y por lo tanto la más utilizada a nivel internacional, se llama a NIC I o lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIEBG) cuando el resultado es negativo para lesiones intraepiteliales o malignidad, aquí no hay evidencia de neoplasia independientemente de si se observan o no microorganismos u otros hallazgos no neoplásicos, compromete 2/3 superiores del epitelio, NIC II o displasia moderada compromete 2/3 inferiores del epitelio y NIC III o displasia in situ cuando compromete todo el epitelio, estas últimas consideradas lesión intraepitelial de alto grado.^(16,29)

Los grados de NIC involucran un cambio etiopatogénico, diagnóstico, pronóstico y terapéutico, el NIC es un cambio en el epitelio que evoluciona como una entidad continua que tiene su origen en la zona de transición de los epitelios. El cambio ocurre en una célula y crece en la zona de transformación que es la metaplasia situada entre el epitelio escamoso original y la zona de transición actual, el NIC puede extenderse al canal endocervical, pero en sentido opuesto, se detiene en su desarrollo a nivel de la unión escamocolumnar original ya que este epitelio estratificado posee ciertos polipéptidos que impiden la proliferación de las células neoplásicas en el NIC, a medida que progresa la lesión se extiende en la superficie epitelial y se acorta el lapso para transformarse en cáncer invasor, así

mismo disminuyen las probabilidades de que permanezca como NIC o que desaparezca sin tratamiento, una vez que aparece el cáncer invasor al romper la membrana basal, se trata ya de una enfermedad distinta con pronóstico y tratamiento propio ^(24,29)

Las lesiones de alto grado incluyen las llamadas neoplasias cervicales intraepiteliales NIC II Y NIC III, (displasia grave y carcinoma in situ), las lesiones de bajo grado incluyen los cambios citológicos característicos de la lesión de VPH o NIC I o displasia leve, estas lesiones contienen en su mayor parte virus de bajo riesgo, razón por la que raramente progresarán. La historia natural de la oncogénesis cervical podría seguir el modelo según el que, al iniciar su actividad sexual, la mujer puede ser contagiada por un virus de alto riesgo que en la mayoría de los casos da lugar a una infección transitoria de 6 a 8 meses, de forma ocasional la infección desarrollará una lesión visible al microscopio, sin embargo los VPH de alto riesgo ejercerán su actividad oncogénica integrándose al genoma, esta interacción en células proliferativa, como las del cuello uterino impide la reparación correcta del ADN conduce a una inestabilidad genómica y aumenta la probabilidad de desarrollar mutaciones específicas y esenciales para la progresión de cáncer invasor, aunque como ya se ha descrito son necesarios otros cofactores para la persistencia y progresión del mismo. Los tipos de VPH mas asociados a cáncer son 16 y 18, hasta en un 85%. ^(24, 28,29)

Se consideran a las adolescentes y a las embarazadas como grupos de riesgo que requieren vigilancia estrecha y seguimiento clínico. Las adolescentes tienen bajo riesgo de un cáncer cervical pero citológicamente se diagnostican con frecuencia lesiones intraepiteliales con tendencia a la curación. Las mujeres embarazadas tiene riesgo mínimo de progresar a un cáncer invasor durante el embarazo, se reporta que 0.05% de todos los embarazos están asociados con cáncer cervical. ^(12, 22, 28,30)

Aproximadamente 1 % de las mujeres con cáncer cervical están embarazadas al tiempo del diagnostico, el aparente incremento de incidencia de cáncer invasivo en gente joven y el inicio cada vez más tardío de la primera gestación induce a pensar que este pueda ser un problema cada vez más frecuente y plantea la necesidad de practicar un tamizaje citológico en la primera visita de cada gestación, en mujeres que no se habían realizado citologías previas. El cáncer invasivo de cérvix durante la gestación es una amenaza para el feto y la madre pero poco frecuente, su incidencia varía de 1 a 15 casos por 10,000 embarazos, los cambios intraepiteliales están asociados con hemorragias. El embarazo es una excelente oportunidad para detectar mujeres con anormalidades citológicas que de otra manera se hubiesen ignorado. Las anormalidades citológicas por otra parte son mucho más comunes y complican el 5% de las gestaciones. Es necesario establecer pautas de conducta correctas para la evaluación de una citología anormal en el embarazo, ya que puede producir en la paciente una ansiedad por los efectos desfavorables sobre madre e hijo ^(19, 22,30)

CÉRVIX Y GESTACION

Debido a la gestación y al aumento de los niveles de estrógenos y progesterona circulantes se producen alteraciones histológicas y anatómicas que modifican las imágenes colposcópicas, así hay un aumento en el volumen cervical o hipertrofia grávida debido a un aumento de la vascularización que produce un color azul por la vasodilatación, edema e hipertrofia del estroma, un incremento del moco, son más marcados en primiparas, comienza en las primeras semanas del embarazo y es fácilmente visible en el segundo trimestre, siendo menos marcado en los siguientes meses del embarazo. También existe una modificación del estroma cervical similar a las que fisiológicamente se produce a nivel endometrial durante el embarazo que va a condicionar una coloración amarillenta y cambios que pueden confundirse con imágenes sospechosas de VPH.^(25,30)

VPH Y GESTACION

Por otra parte el embarazo altera la respuesta inmunitaria y puede estimular la replicación viral por las altas tasas de estradiol y progesterona, la prevalencia en el embarazo es altamente discordante debido a las diferencias de técnicas usadas en el diagnóstico, algunos estudios mencionan que la prevalencia de VPH es la misma en mujeres embarazadas que en las no embarazadas y sin significado estadístico en las anomalías citológicas que derivan de las infecciones por VPH; otros estudios sugieren que la prevalencia de VPH en la gestación es más alta que en el periodo posparto⁽³¹⁾, variando entre un 45-50% frente al 31% en el puerperio.

Algunas teorías que se han postulado para explicar estos hallazgos implican que: las gestantes tienden a tener menos compañeros sexuales que las no gestantes y entonces tienen menos posibilidades de adquirir nuevas infecciones por VPH. También se puede explicar por la posible activación viral por las hormonas y factores inmunológicos, disminución de la inmunidad mediada por las células y una respuesta inmune humoral menor. También se ha demostrado que hay poco aclaramiento viral durante el embarazo, compensado con un mayor aclaramiento en el post parto, en las embarazadas infectadas por VPH en relación al observado en las no embarazadas en un mismo periodo de tiempo, puede ser explicado por el traumatismo del parto con posterior reparación tisular, el aclaramiento viral precede en 3 meses a la regresión de lesiones cervicales. Esto podría expresar una probable regresión de lesiones posparto, la posibilidad de progresión de las lesiones cervicales intraepiteliales durante el embarazo es mínima, ante un diagnóstico de NIC I Y II las posibilidades de malignización son mínimas y se puede referir a estudio posparto en vez de seguimiento citocolposcópico ante parto. Si se diagnostica un cáncer invasivo la estrategia a seguir dependerá de las semanas de gestación del producto.^(19,28)

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS:

Las lesiones de VPH pueden afectar de forma aislada o multicéntrica y multifocal a cualquier parte de tracto genital inferior y región perianal por lo que se debe hacer un estudio exhaustivo de los genitales femeninos, aunque el diagnóstico es clínico en la mayoría de los casos, la posible presencia de infecciones subclínicas, asintomáticas o latentes, han favorecido el desarrollo de una variedad de técnicas de tamizaje diagnósticas, entre las que destacan las morfológicas para detección de virus (citología, colposcopia, histopatología), inmunohistoquímicas para detección del antígeno viral en la lesión y las basadas en la detección de ADN viral. La exploración física deberá incluir una inspección minuciosa de toda la vulva y región perianal y un examen detallado con un espéculo del cuello uterino, dada la frecuente multicentricidad de la lesión.⁽²³⁾

CITOLOGÍA:

Surgió como un procedimiento diagnóstico diseñado por Papanicolau, quien con el objeto de comunicar sus hallazgos, ideó una clasificación diagnóstica, la cual ha ayudado a ampliar el conocimiento de la historia natural de CaCu.

La citología mediante Tinción de Papanicolau puede detectar alteraciones celulares que son indicativas de infección por VPH, no es un método diagnóstico sino de tamizaje de lesiones preneoplásicas, sin embargo con esta técnica se observa un alto porcentaje de falsos negativos, por lo cual para disminuir el número de falsos negativos se han introducido varios sistemas de recolección, procesamiento y valoración de ésta, como son:

1. La citología en medio líquido que consiste en la toma simultánea de tejido de la región endo y exocervical con cepillo citobrush, mismo que se introduce en una solución líquida, se pasa por un filtro y se transfiere a un laminilla. Esta muestra se prepara a medida que se eliminan los detritus celulares y distribuye las células en mono capas lo cual hace más fácil su interpretación.
2. Técnicas computarizadas o equipos automatizados que seleccionan campos anormales para que sean interpretadas por el citólogo.

La nomenclatura se basa en el sistema Bethesda su aporte principal fue la creación del término LIEBG y LIEAG. Este sistema combina cambios condilomatosos planos VPH y NIC I, en LIEBG y NIC II-NIC III en LIEAG.⁽²⁷⁾

TABLA 2. Sistema Bethesda.

<ul style="list-style-type: none"> • SISTEMA BETHESDA:
<p>Lesiones e interpretaciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> • No lesión intraepitelial • Anomalías de células escamosas • Célula escamosa • Célula escamosa atípica (ASC) • De significado incerto (ASC-US) • No puede descartarse LIEBG(ASC-H) • Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LIEBG) • Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LIEAG) • Carcinoma de células escamosas • Glandular • Células glandulares atípicas (AGC) (endocervicales, endometriales o no específicas) • Células glandulares atípicas, probablemente neoplásicas, (endocervicales, endometriales o no específicas) • Adenocarcinoma endocervical in situ (AIS) • Otros • Células endometriales no atípicas en mujeres de 40 años

COLPOSCOPIA:

Es un método de exploración de cuello uterino, vagina, vulva y región perianal que apareció en 1925 y fue ideado por el Dr. Hans Hinselman quien estableció la terminología para designar las lesiones observadas, es un procedimiento exploratorio instrumentado en el que se emplea un aparato con sistemas ópticos de aumento a través del cual se puede observar el tracto genital inferior y el ano, visualizándose las condiciones del epitelio tras la aplicación de ácido acético al 5% en yodo-lugol, considera varios factores: contorno de la superficie, color y márgenes de la lesión, patrones vasculares, distancia intracapilar y tiempo en que la lesión permanece blanca después de la aplicación de ácido acético, Se han descrito varias escalas colposcópicas, las lesiones de LIEBG tienen el aspecto de una lesión acetoblanca plana o condiloma exofítico, son cambios variables desde un color blanco rosado, transparente, el contorno puede ser lesiones planas y zonas ligeramente elevadas hasta condilomas acuminados exofíticos y floridos, se pueden describir similares a una cola de pavo, flecos y/o con aspecto de mapa.^(27,32)

BIOPSIA:

Toda lesión sospechosa en la colposcopia debe ser biopsiada, dado su relación con las lesiones preneoplásicas, se recomienda tomar una muestra en todos los condilomas cervicales localizados en la conjunción escamocilíndrica, cuando la

lesión no responde al tratamiento, cuando son pigmentados, ulcerados o de lesiones papulares o maculares, así como en los epitelios acetoblanco en el cuello uterino, especialmente los que están localizados en la unión escamoso columnar; en vulva sólo se aconseja tomar tejido de aquellos que aparezcan bien delimitados, la biopsia de la lesión sospechosa es una forma rutinaria y establecida para confirmar el diagnóstico histopatológico y permite un diagnóstico de gran precisión sobre el grado de lesión precursora o malignidad.⁽²⁷⁾

DIAGNÓSTICOS MOLECULARES:

Las técnicas de Biología Molecular permiten la identificación de ADN viral presente en la muestra, tienen una elevada sensibilidad y especificidad y son los únicos métodos que permiten identificar el tipo de VPH y la presencia de infecciones mixtas,⁽³²⁾ entre las más empleadas están:

- a) Técnicas de hibridación molecular (captura de híbridos)
- b) Técnicas de amplificación del genoma (PCR).

Captura de híbridos es una técnica que permite la detección de VPH por grupos de riesgo, los primeros utilizados permiten la detección de todos los tipos virales diferenciándolos solo como grupos de alto o de bajo riesgo sin especificar el genotipo de VPH presente.

La principal ventaja al emplear la técnica de reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) es el análisis de una gran variedad de muestras (raspados cervicales, exudados vaginales, orina), debido a esto es de las más utilizadas; en varios estudios de La Cruz y Mendoza utilizaron técnicas de PCR para identificación de VPH^(33,34). Carrillo y col. en un estudio utilizaron métodos moleculares para obtener correlaciones de CACU y neoplasias de bajo grado con la genotipificación⁽³⁵⁾.

La PCR en tiempo real es una de las técnicas más novedosas, radica en la capacidad de asignar valores cuantitativos reales a los amplificadores, mediante sondas marcadas con fluorocromos, este método es más complejo que los anteriores y de reciente empleo, requiere del diseño de sondas específicas de cada uno de los genotipos de VPH.

Estos métodos han sido aprobados por la Federal Drugs Administration (FDA), ya que la detección de los genotipos de VPH juega un papel importante en la clínica de las pacientes con lesiones pre invasivas de cuello o hasta como complemento de la citología^(36,37, 38)

Por lo tanto las técnicas de biología molecular han sido extensamente utilizadas para detectar y subdividir los tipos de VPH en baja, intermedio y alta capacidad oncogénica, se ha planteado la posibilidad de utilizar estas técnicas como un recurso para definir a las pacientes cuyos resultados en la citología son atipia celular de significado incierto.^(39,40,41)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

El espectro de enfermedad ocasionado por la infección por el VPH es muy amplio, incluye pacientes con neoformaciones benignas, displasia celular, lesiones malignas y el riesgo de evolución de la enfermedad a cáncer invasor. El Instituto Nacional de Perinatología (INPer) atiende una gran variedad de pacientes con alteraciones ginecológicas que representan una muestra amplia de la población obstétrica que permite el estudio del curso de la infección por el VPH y las condiciones médicas que pueden modificar el curso de la infección.

Actualmente existen avances tecnológicos importantes en relación al diagnóstico de enfermedades infecciosas, como aquellos que emplean metodologías relacionadas con Biología Molecular que se basan en la amplificación de ácidos nucleicos y que brindan un resultado confiable y oportuno sobre la presencia de material genético del virus, además de la identificación de los diferentes genotipos del VPH, los cuales están relacionados con un pronóstico y un tipo de tratamiento diferente para las pacientes infectadas, por lo que se es importante conocer los genotipos de VPH que más frecuentemente afectan a las pacientes de nuestra institución.

JUSTIFICACIÓN:

El VPH es una entidad clínica que muchas veces es difícil de identificar clínicamente y que puede pasar desapercibido. Se cuenta con un sistema de clasificación (Bethesda) desarrollado específicamente para la identificación de lesiones observadas por colposcopia a pesar de esto aun se reportan hasta un 20-40% falsos negativos.

La presencia de ciertos genotipos se ha relacionado con el desarrollo de algunas lesiones a carcinomas invasivos.

Las técnicas de Biología Molecular presentan un mayor sensibilidad y han sido extensamente utilizadas para detectar la presencia de VPH como un recurso para definir en las pacientes con atipia celular de significado incierto quiénes requieren de colposcopia y biopsia , el propósito de esto es unir criterios sutiles de la citología con la detección del virus por técnicas moleculares.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Cuáles son los genotipos de VPH aislados con mayor frecuencia en la población de pacientes infectadas por este virus en el INPer?

OBJETIVO GENERAL:

Identificar los genotipos mas frecuentes de VPH en mujeres con infección utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Establecer la asociación entre genotipos virales y entidad clínica.
- Establecer la asociación entre genotipos virales y lesiones oncogénicas de bajo o alto grado

HIPOTESIS:

- 1) La infección por los genotipos 16 y 18 del virus de papiloma humano (VPH) son los de mayor frecuencia en la población del INPer.
- 2) El tipo de lesión sugestiva de infección por el virus de papiloma humano (VPH) se encuentra relacionada al genotipo.
- 3) La infección por genotipos de alto riesgo del virus de papiloma humano (VPH) se asocian con neoplasia intracervical en la población del INPer

TIPO DE ESTUDIO

Estudio retrospectivo, observacional, descriptivo.

POBLACION DE ESTUDIO

Pacientes del INPer que cursen con infección por el VPH.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- 1) Mujeres con lesiones genitales de condiloma acuminado
- 2) Mujeres con lesiones cervicales compatibles con displasia por VPH
- 3) Pacientes con sospecha de infección por VPH atendidas en el INPer

CRITERIO DE EXCLUSIÓN:

- 1) Pacientes sin información completa en el expediente clínico
- 2) Pacientes que no se encuentra expediente clínico

VARIABLES INDEPENDIENTES:

Infección por VPH

VARIABLES DEPENDIENTES:

Genotipo Viral

METODOLOGÍA:

A) MUESTRAS

Se analizaron muestras de cepillados de endocérnix y/o muestras de las neoformaciones genitales de pacientes embarazadas y no embarazadas atendidas en el periodo del año 2007 al 2009, obtenidas a través de la consulta externa del servicio de Infectología y colposcopia con lesiones de condilomas en la región genital y/o perineal, o con lesiones cervicales compatibles con infección por el VPH.

B) GENOTIPIFICACION DE VPH

La genotipificación de Virus del Papiloma Humano se realizó mediante la técnica Linear Array HPV Genotyping Test (Roche).

La metodología se llevo a cabo de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Esta prueba es cualitativa específica para la detección de VPH en muestras clínicas, detecta 37 genotipos virales incluidos 13 de alto riesgo (ver tabla 2) y se basa en cuatro pasos:

Genotipificación de Virus del Papiloma Humano mediante la técnica Linear Array HPV Genotyping test (Roche).

A) Extracción de ADN

El aislamiento y purificación del ADN se lleva a cabo en una columna. El gen de la β globina se aísla de forma simultánea y garantiza la adecuación celular, la extracción y amplificación de cada muestra es procesada individualmente.

De la muestras de raspado cervical se tomó una alícuota de 250 μ l y se colocó en un tubo eppendorf de 2.0 ml, se adicionaron 80 μ l de la solución de lisis, se colocó en un termoblock a 56 $^{\circ}$ C durante 30 min. El ADN se libera por acción la lisis de muestras de células cervicales bajo condiciones de desnaturalización a temperaturas elevadas, utilizando proteinasa K, al finalizar la incubación, se pipetearon 250 μ l de la solución de trabajo a cada tubo, se mezcló en vortex 10 seg. y se incubó a 70 $^{\circ}$ C por 15 minutos en un term oblock.

Para lograr la precipitación del ADN, se adicionaron 300 μ l de alcohol absoluto a cada tubo y se mezclaron en vortex por 15 seg., se incubaron a temperatura ambiente por 5 min., cada lisado se transfirió a una columna conectada en una

bomba vacío, en la cual se adicionan 750 µl de solución de lavado y se hizo pasar vacío para capturar el ADN en el filtro de la columna. Se adicionaron 750 µl de etanol absoluto a cada columna y se hizo pasar nuevamente vacío.

Las columnas se transfirieron a tubos de recolección de 2.0 ml y se centrifugaron a 15,000 rpm durante 3 min., para eliminar residuos celulares, la columna se transfirió a un nuevo tubo y se adicionaron 120 µl de solución eluyente, se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. y finalmente para recuperar el ADN se centrifugaron a 15,000 rpm durante 1 min. El ADN queda en la solución, los tubos se etiquetan y refrigeran hasta su uso.

B) Amplificación del DNA blanco mediante PCR.

La prueba utiliza oligonucleótidos biotinilados para definir una secuencia de nucleótidos en la región L1 polimórfica del genoma del VPH, contenidos en la mezcla maestra (MMX), diseñados para amplificar el ADN de 37 genotipos de VPH. Un par de primer adicional se dirige al gen de la β globina.

La MMX viene preparada en una solución que contiene la enzima DNA polimerasa, dNTPS, Mg^{2+} , el juego de oligonucleótidos biotinilados de cada genotipo de VPH y el de la β globina, además de la enzima Amperasa, cuya función es la de descontaminar la muestra antes de iniciar la amplificación a una temperatura óptima de 50 °C. La MMX antes de usarla debe agitarse suavemente invirtiendo el tubo de 10 a 15 veces.

La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 100 µl, el cual contenía 50 µl de MMX y 50 µl del DNA extraído de cada muestra y el de los controles (Control Negativo y Control Positivo). Enseguida los tubos se colocaron en un termociclador donde se llevó a cabo la amplificación. Para la amplificación se siguieron las siguientes condiciones: 1 ciclo de activación para la Amperasa (2 min/50 °C), 1 ciclo de desnaturalización (9 min/95 °C), 40 ciclos de amplificación (30 seg /95 °C, 1 min/55 °C, 1 min/72 °C), y un ciclo de extensión final (5 min/72 °C), el equipo mantiene la muestra a 72 °C hasta el momento de agregar el desnaturalizante.

Al terminar la amplificación, se retiraron los tubos del equipo y se agregó a cada uno 100 µl de solución desnaturalizante, para eliminar cualquier resto de la enzima e impedir de este modo la degradación de los amplicones objetivo.

C) Hibridación de los productos amplificados.

Se transfirieron 75 µL del amplicón desnaturalizado a una charola (dividida en varios canales) que contenía 4 ml de una solución de hibridación y una tira de genotipado de VPH (tira de nilón revestida con sondas de ADN de VPH y β globina, se incubó en baño María a 53 °C/30 min. en agitación (60 rpm). El amplicon marcado con biotina se hibrida con alguna de las sondas sólo si contiene la secuencia correspondiente.

D) Detección

Después de la hibridación se lavaron las tiras para eliminar el material no fijado, utilizando 4 ml de solución de lavado en cada canal, se agitó manualmente y se retiró el sobrenadante de cada división, empleando una bomba de vacío, se añadieron nuevamente 4 ml de solución de lavado a cada canal, se incubaron en baño María a 53 °C/15 min. en agitación (60 rpm), y se retiró el sobrenadante de cada división. Después se añadieron 4 ml del conjugado Streptavidina peroxidasa de rábano picante (SHA-RP), Incubamos a Temp. Amb. /30 min. en un agitador orbital, el conjugado se une al amplicon marcado con biotina e hibridado con las sondas oligonucleótidos sobre la tira, se añadió nuevamente 4 ml de solución de lavado a cada canal, se incubó Temp. Amb. /10 min. en agitación (60 rpm) y se retiró el sobrenadante de cada pozo. Se añadieron 4 ml de sustrato (solución que contiene Tetrametilbenzidina (TMB)) y Peróxido de Hidrogeno. Incubamos a Temp. Amb. /5 min. en un agitador orbital (Protegido de la luz), y se retiró el sobrenadante de cada pozo. Finalmente añadimos 4 ml de agua desionizada a cada pozo y se mantuvo en un agitador orbital hasta observar la aparición de bandas. Cuando un resultado es positivo la reacción da un color azul en la posición correspondiente a el (los) genotipo (s) presente (s) en la muestra.

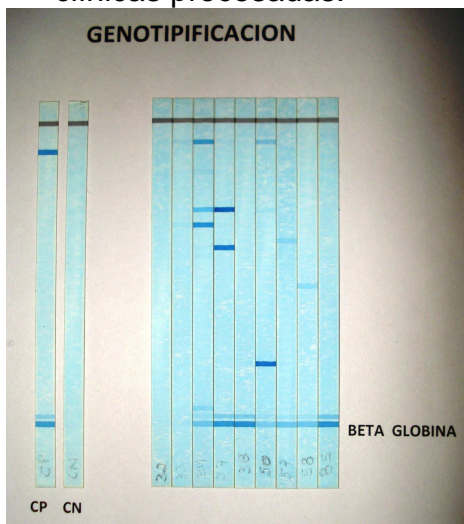
TABLA 2. GENOTIPOS DE VPH IDENTIFICADOS CON EL KIT
Linear Array HPV Genotyping test (Roche).

CLASIFICACION	GENOTIPOS DE VPH
ALTO RIESGO	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68
BAJO RIESGO	6, 11, 26, 40, 42, 53, 54, 55, 61, 62, 64, 66, 67, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82(MM4), 83(MM7), 84 (MM8), IS39, CP6108.

RESULTADOS:

Para la identificación de los genotipos de VPH que pudieran estar presentes en las muestras analizadas, se comparó la posición de las bandas azules con el patrón de referencia proporcionado por el fabricante (fotografía 1) de acuerdo a los siguientes pasos:

1. Observación de la banda correspondiente a la β globina, que es un control interno y que nos indica que no hubo inhibición de la PCR.
2. Lectura de las bandas correspondientes en los controles negativo y positivo. Lo que nos valida nuevamente la prueba. (fotografía 1). En el control negativo la tira permanece blanca en toda su extensión, mientras que en el control positivo aparece una banda azul que corresponde al genotipo 16.
3. Análisis individual de cada una de las tiras correspondientes a las muestras clínicas procesadas.



Fotografía que muestra la banda de β globina

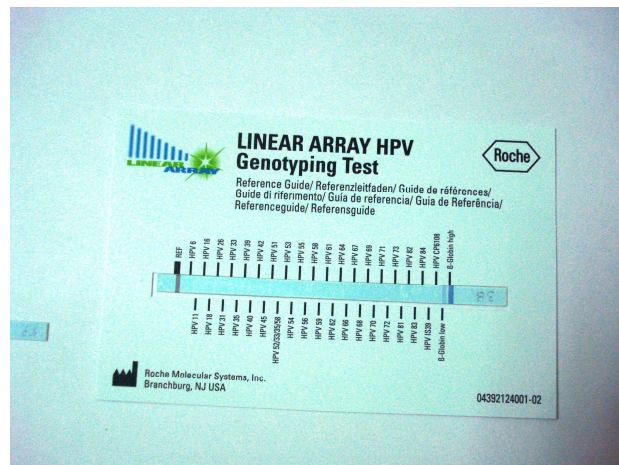


Imagen que muestra el patrón de lectura para correlacionar las muestras problema

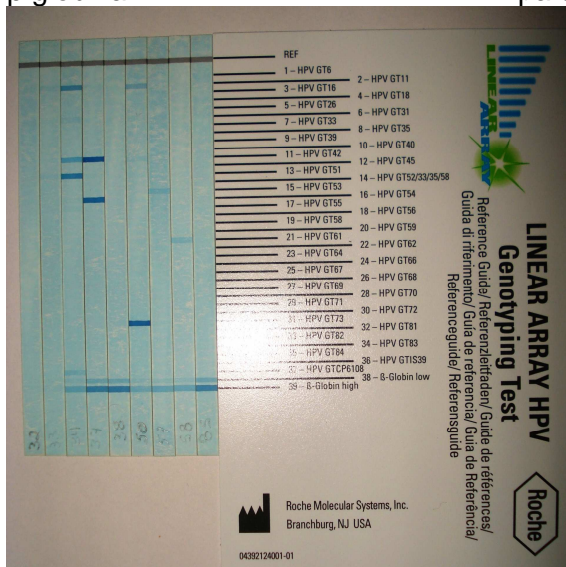


Imagen que muestra las bandas de identificación de genotipos y su comparación con el patrón de lectura para asignar al genotipo de VPH presente.

Una vez obtenidas las lecturas de cada muestra y con el objetivo de valorar los genotipos más comunes, en este trabajo se realizaron divisiones por grupos para identificar los factores relacionados en nuestra población en estudio. Se estudiaron un total de 65 pacientes, 29 pacientes ginecológicas (45%) y 36 pacientes obstétricas (55%) Figura 1

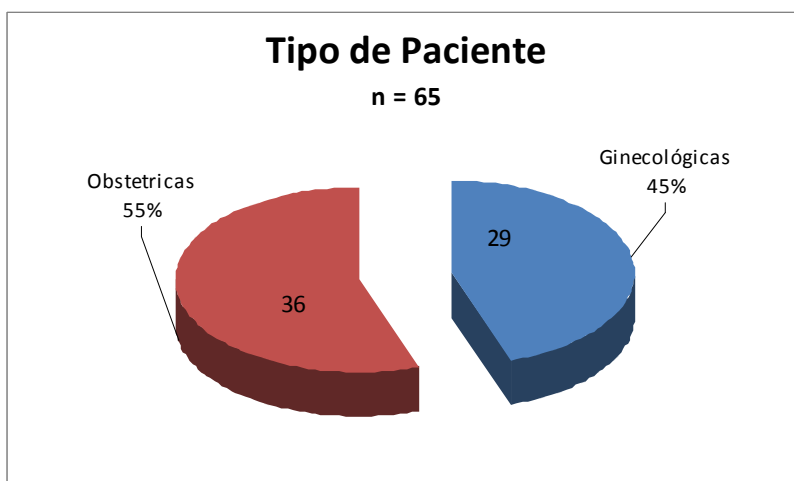


Figura 1. Clasificación de las pacientes de acuerdo al servicio de atención al momento del diagnóstico de la infección por VPH

De las pacientes procedentes del servicio de obstetricia 4 estaban embarazadas al momento de la toma de muestra (11%) y 32 con resolución del embarazo (89%). Figura 2.

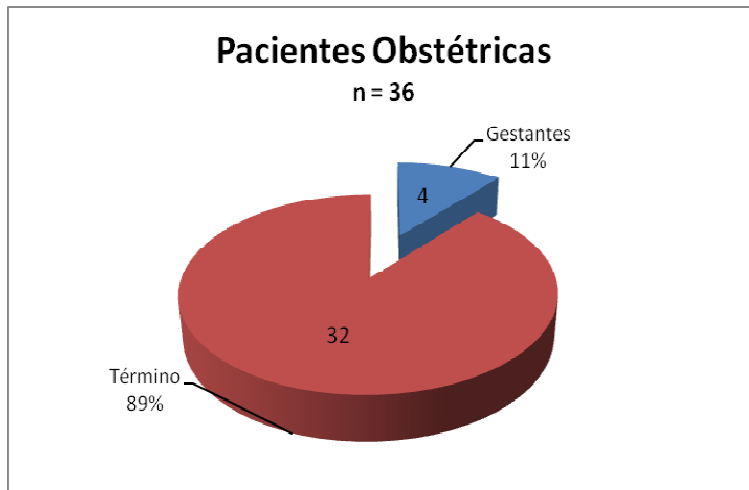


Figura 2. Condición fisiológica de las 36 pacientes obstétricas incluidas en el estudio

De las mujeres que resolvieron su embarazo 21 (66%) tuvieron embarazo de término y 11 (34%) fueron pacientes con diagnóstico de parto pre término. El intervalo de semanas de gestación va de las 17 a 40 SDG. Figura 3

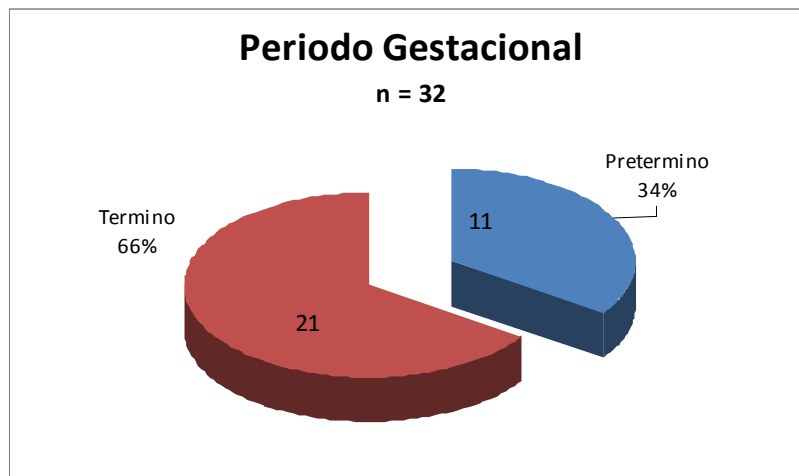


Figura 3. Tiempo de resolución del embarazo de 32 pacientes obstétricas con infección por VPH

De acuerdo a su estado civil se clasificaron en solteras 28 (43%), casadas 18 (28%), viviendo en unión libre 19 (29%). Figura 4

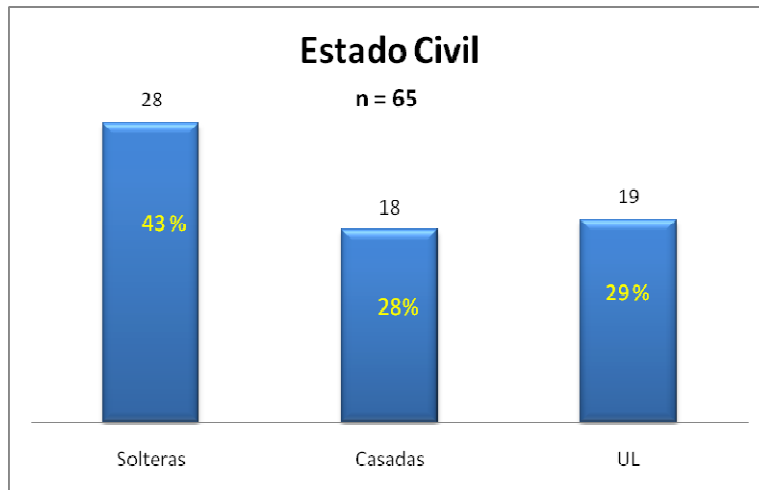


Figura 4. Estado civil de 65 pacientes con infección por VPH

La edad de las pacientes vario de los 15 a 48 años, y se dividieron cuatro grupos, la mayor parte se incluyo en los grupos de 18 a 25 años 21 (31%) y de 26 a 35 años con 25 mujeres que representan el 38%. Figura 5.

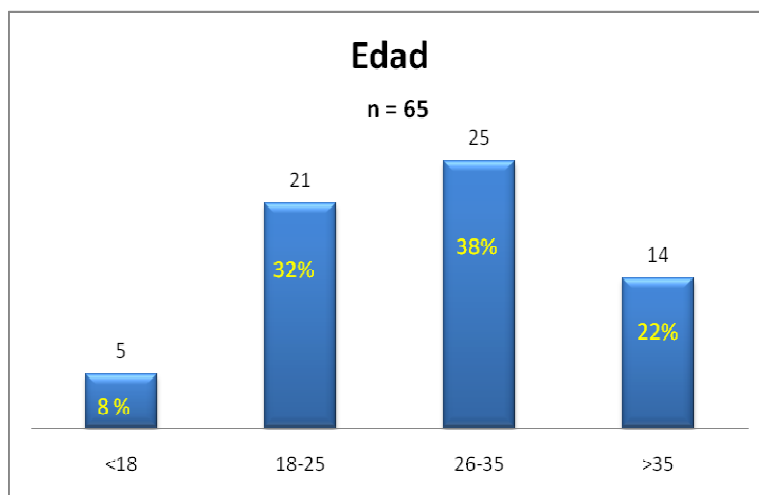


Figura 5. Distribución en grupos de edad de las 65 pacientes incluidas en el estudio de VPH.

Se hizo una clasificación de acuerdo al nivel socioeconómico asignado por el Instituto; dentro del nivel 1 se agruparon 7 pacientes (11%), en el nivel 2 a 33 pacientes (51%), en el nivel 3 a 22 mujeres que representan el 34% y en el nivel 4 a 3 pacientes (4%). Figura 6

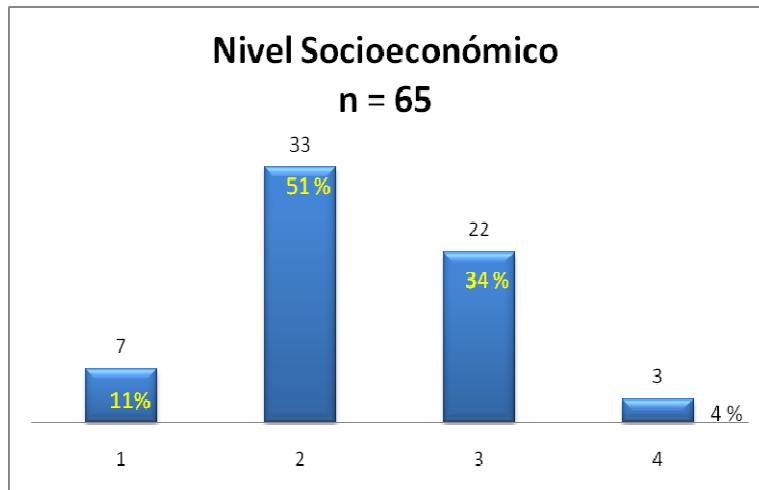


Figura 6. Nivel socioeconómico de las 65 pacientes incluidas en el estudio

Los niveles de escolaridad de las pacientes comprendieron la siguiente división:

Primaria completa 7 pacientes (11%), secundaria 17 pacientes con (34%), bachillerato o carrera técnica 27 pacientes (26%) y solo 12 pacientes con nivel licenciatura (18%). Figura 7

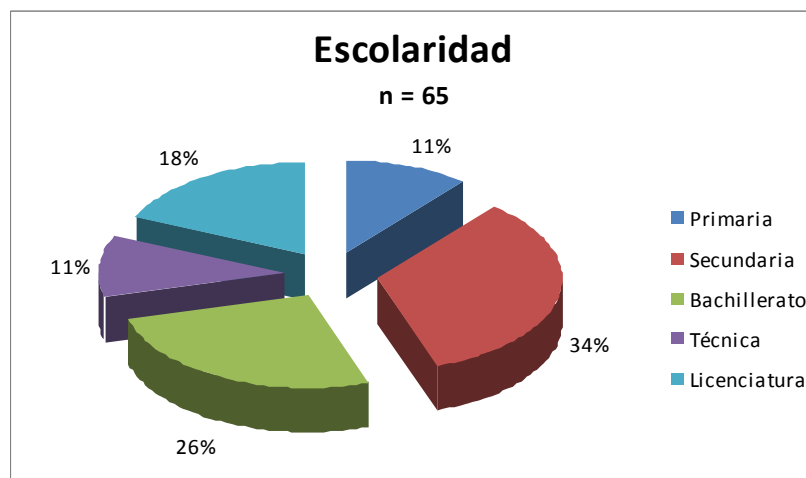


Figura 7. Escolaridad de las 65 pacientes infectadas por VPH

No todas las pacientes fueron económicamente activas, sólo 13 pacientes tenían una actividad remunerada económicamente (20%), no remuneradas fueron 52

pacientes, cuya actividad incluyo; 46 pacientes dedicadas exclusivamente al hogar (88%), 3 estudiantes (6%) y 3 pacientes no tenían empleo (6%). Figuras 8 y 9

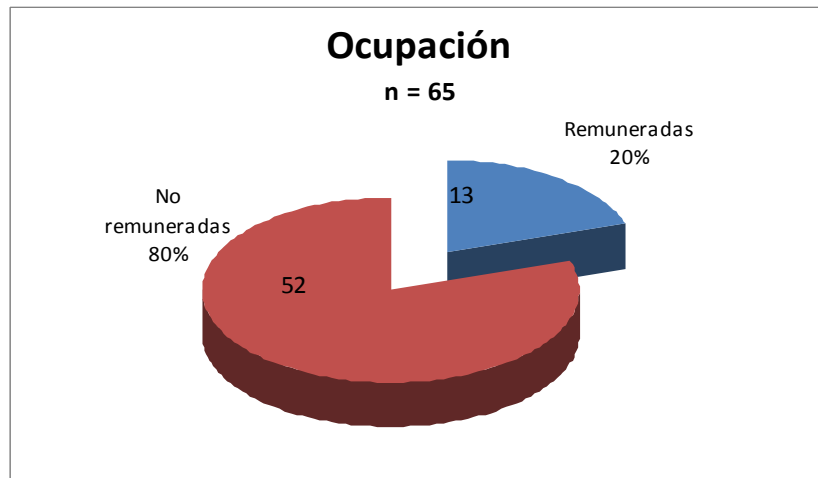


Figura 8. Clasificación de las pacientes de acuerdo a si perciben o no remuneración por la actividad relacionada

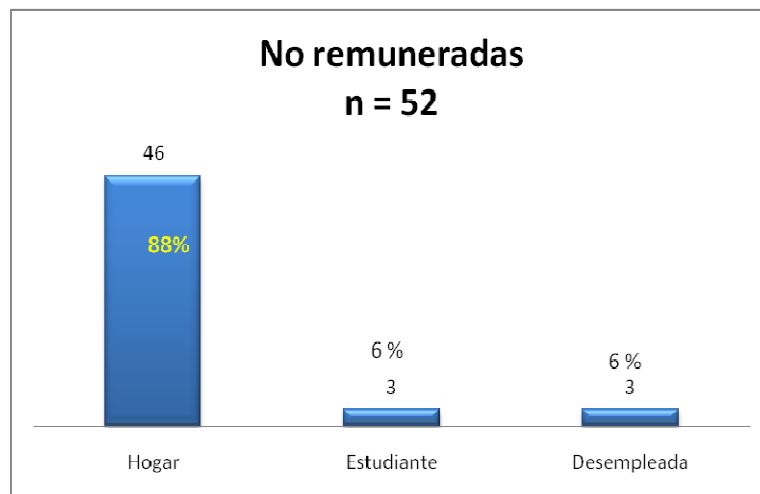


Figura 9. Desarrollo social de las pacientes que no perciben remuneración por la actividad que desarrollan

Clasificándolas por IVSA se tiene que 25 pacientes iniciaron a edad menor de 18 años (38%), 32 pacientes (49%) se incluyeron en el grupo de edad de 18 a 25 años mientras que en el grupo que se inicio sexualmente entre los 26 a 35 fueron

7 pacientes (11%), en el grupo de mayores de 35 años solo se reporta 1 paciente (2%). Figura 10.

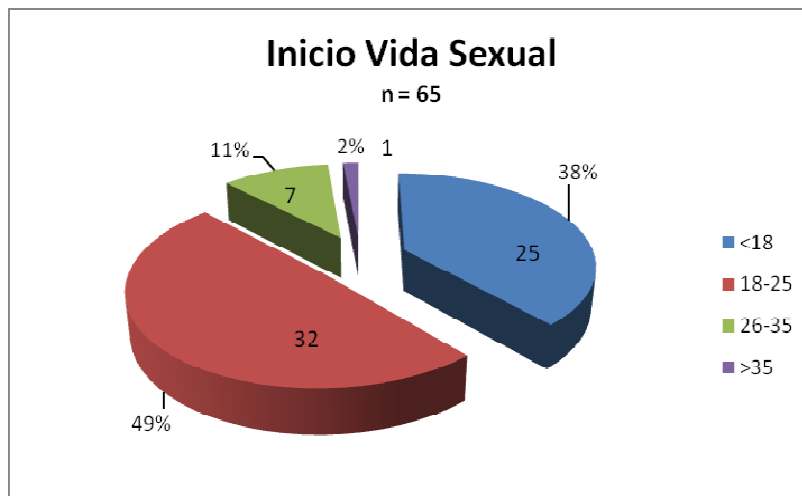


Figura 10. Edad de inicio de vida sexual, en las 65 pacientes incluidas en el estudio de VPH

Analizando la información relacionada con el número de parejas sexuales, de las 65 pacientes incluidas en este estudio, 21 (37%) habían tenido una sola pareja sexual (32%), 15 (23%) refirieron haber tenido dos parejas sexuales, 15 (23%) tres parejas sexuales y 14 (22%) en cuyo historial hay más de tres parejas sexuales. Figura 11.

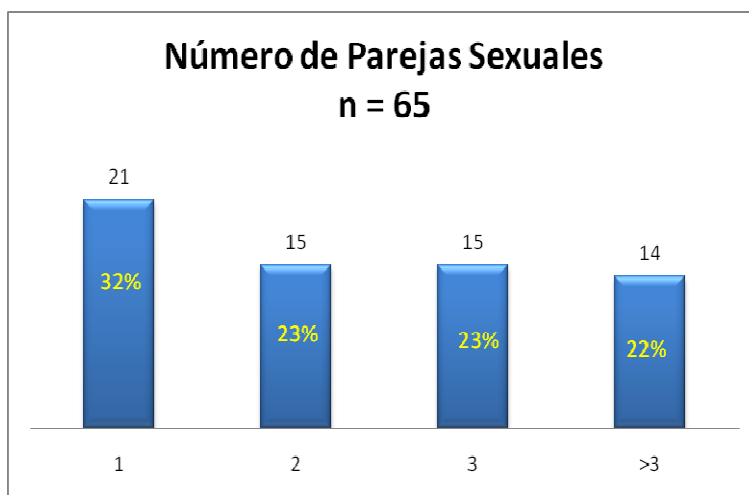


Figura 11 Número de parejas sexuales manifestado por las 65 pacientes con infección por VPH.

Dentro del seguimiento que se les da a las pacientes, una vez establecido el diagnóstico de VPH, se incluye la toma de un exudado cérvicovaginal, con el fin de identificar si hay o no otras infecciones de transmisión sexual (ITS) asociadas a VPH. De estos estudios pudimos observar que 41 de las 65 pacientes (63%) desarrollaron en el cultivo gérmenes considerados parte de la flora habitual de vagina, en 17 mujeres (26%) se detectó únicamente un microorganismo patógeno y en 7 (11%) se determinó la presencia de infecciones mixtas. Figura 12.

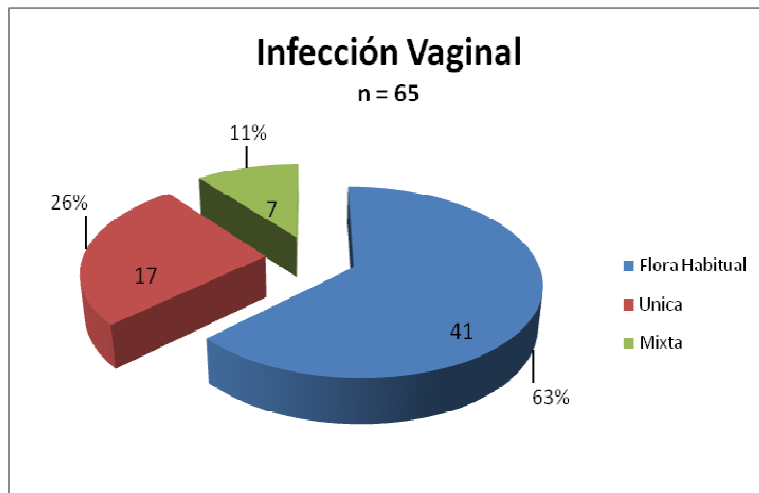


Figura 12. Distribución de los aislamientos de 65 cervicovaginales obtenidos de las pacientes estudiadas con infección por VPH.

Si agrupamos a las pacientes por ITS asociada a VPH encontramos que en 24 mujeres con antecedentes relacionados a una infección genital: una paciente presentaba sífilis (4%), 2 presentaban clamidiosis (8%), 4 pacientes con diagnóstico de ureplasma (17%), 4 pacientes con molusco contagioso (17%) 9 pacientes con diagnóstico de vaginosis bacteriana (38%) y 11 pacientes con candidiasis (46%). Figura 13. En la Tabla 3 podemos observar las infecciones mixtas encontradas en la población en estudio.

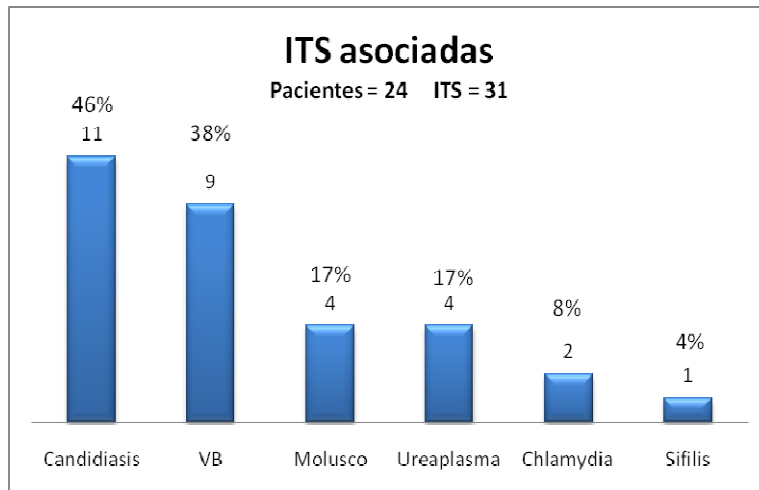


Figura 13. Distribución de 31 infecciones de transmisión sexual detectadas en 24 pacientes con VPH

Tabla 3. Microorganismos aislados en los 7 casos de infecciones mixtas asociados a pacientes infectadas por VPH.

CASOS	ITS ASOCIADAS	
1	CANDIDIASIS	CLAMIDIOSIS
2	CANDIDIASIS	VAGINOSIS
3	MOLUSCO CONTAGIOSO	VAGINOSIS
4	SIFILIS SECUNDARIA	VAGINOSIS
5	CANDIDIASIS	UREAPLASMA
6	VAGINOSIS	UREAPLASMA
7	MOLUSCO CONTAGIOSO	UREAPLASMA

Con relación al tiempo de saberse infectado por VPH una paciente fue diagnosticada desde el 2004 (1.5%), otra más en el 2005 (1.5%), 2 durante el 2006 (3%), 3 en el transcurso del 2007 (5%), 37 pacientes en el 2008 (57%), 20 pacientes durante el 2009 (31%) y 1 paciente de 2010 (1%). Figura 14.

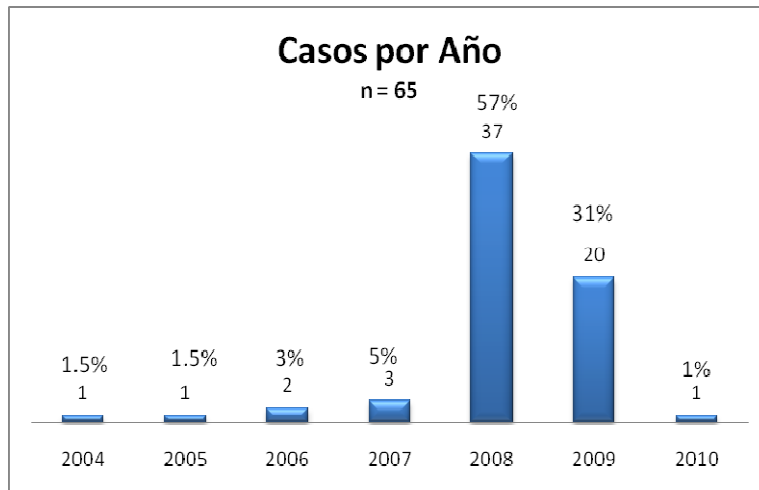


Figura 14. Número de casos de VPH diagnosticadas de 2004 a 2010.

En base a los resultados de patología se obtuvieron los siguientes datos: cabe referir que 36 pacientes se clasificaron dentro del grupo de condilomas (55%) y 25 pacientes en el rubro de displasia (39%) y 4 no presentaron lesiones. Figura 15.

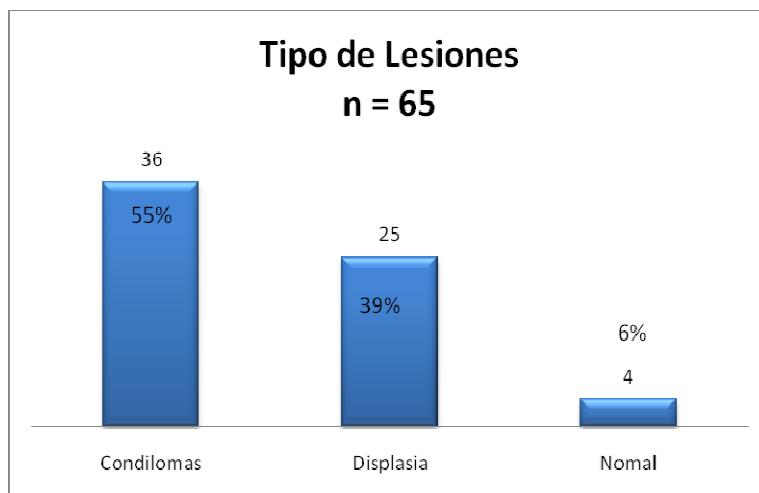


Figura 15. Distribución del tipo de lesión presente en las 65 pacientes estudiadas.

En el grupo de displasias se subdividieron de acuerdo al grado de lesión histológica; 18 pacientes dentro del grupo de NIC I (72%), 2 pacientes con NIC II (8%), 2 paciente con NIC III (8%), 2 pacientes con CACU IN SITU (8%) y 1 paciente con CACU invasor (4%), Figura 16

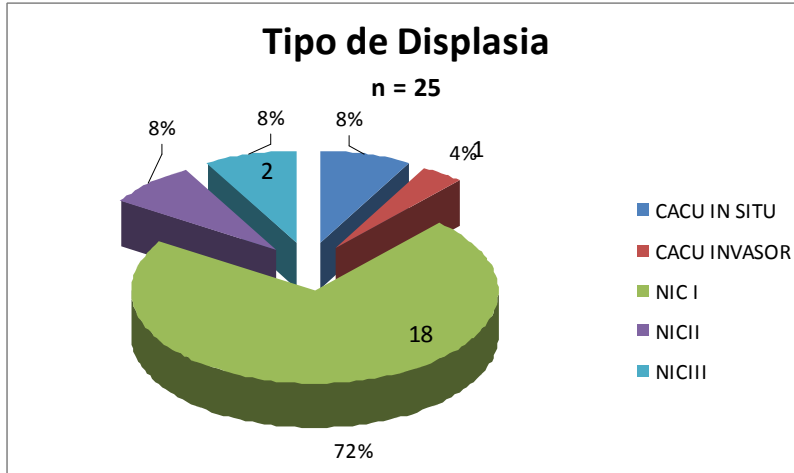


Figura 16. Tipo de displasia encontrada en 25 pacientes afectadas.

Para el tratamiento que se le aplica a cada paciente, debe tomarse en consideración la clasificación histológica en donde se agrupan, por lo que los tratamientos incluyeron: 46 pacientes a las cuales se les manejo con ATCA (71%), 10 pacientes se le realizaron conización (15%), 3 pacientes se les realizo HTA (4%), 2 pacientes con crioterapia (3%), 1 paciente a la que se le manejo con electrocirugía (2%) y 3 pacientes a las que no se les realizó ningún procedimiento ya que se derivaron a otro hospital.(5%). Figura 17.

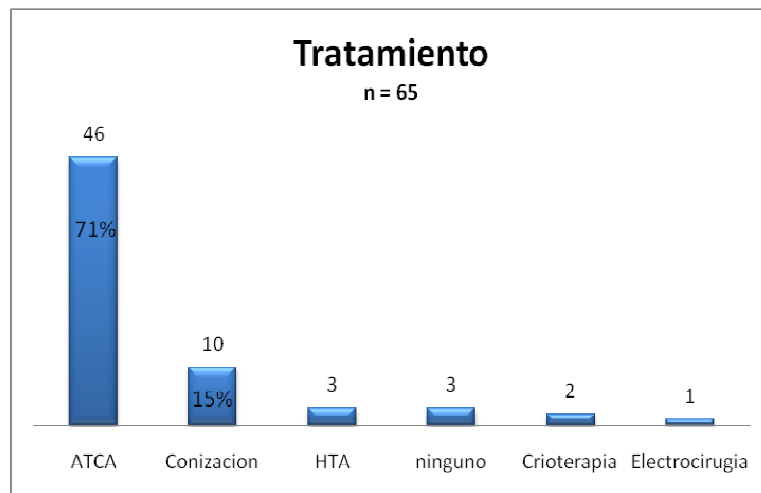


Figura 17. Tratamiento aplicado a 65 pacientes infectadas por VPH.

Si analizamos los genotipos encontrados en las 65 muestras analizadas, en 29 (45%) pacientes no se pudo determinar si había VPH, mientras que en 36 si se

detecto en 14 (21%) un genotipo, en 17 (26%) dos, en 3 (5%) tres y en 2 casos (3%) cuatro genotipos por muestra. Figura 18.

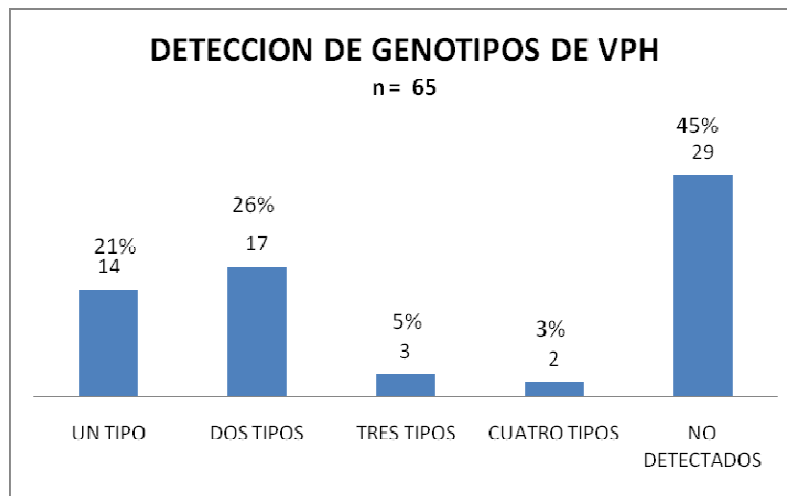


Figura 18. Distribución de los genotipos detectados en 65 pacientes infectadas por VPH.

La combinación de los genotipos detectados nos permitió separar a las pacientes en dos grupos: uno compuesto por 23 pacientes en donde se detectaron de 1 a 3 genotipos exclusivamente de bajo riesgo. Tabla 4 y un segundo grupo de 13 pacientes en donde 10 de ellas tenían en combinación genotipos de alto y bajo riesgo y 3 pacientes solo se identificaron genotipos de alto riesgo. Tabla 7.

Tabla 4. Descripción de 23 pacientes en los cuales se identificó genotipos de bajo riesgo. (GBR)

CASO	LESIONES	GENOTIPOS IDENTIFICADOS			EDAD	AÑOS DE ESTUDIO	IVSA	PS
1	CONDILOMA MIXTO	6			18	9	15	3
2	CONDILOMA MIXTO	6			22	9	18	3
3	CONDILOMA MIXTO	6			33	9	23	1
4	CONDILOMA MIXTO	6			46	6	22	5
5	CONDILOMA VULVAR	6	6108		30	12	30	1
6	CONDILOMA VULVAR	6	6108		35	9	20	1
7	CONDILOMA VULVAR	6		53	26	12	22	2
8	CONDILOMA VULVAR	6			15	6	13	2
9	CONDILOMA VULVAR	6			35	12	17	6
10	CONDILOMA VULVAR	61			30	9	16	2
11	CONDILOMA VULVAR		54	42	27	12	14	5
12	CONDILOMA VULVAR		55		21	6	16	1
13	CONDILOMA VULVAR			53	36	9	22	3
14	CONDILOMA VULVAR			53	21	9	17	3
15	LIEBG	6			26	9	15	1
16	LIEBG	6			37	12	18	3
17	LIEBG	83		53	22	12	20	1
18	NIC I	6	55		17	12	17	1
19	NIC I	11		66	21	9	16	2
20	NIC I	61	71		43	12	24	2
21	NIC I			53	24	9	19	2
22	SIN LESION	6	62	81	23	9	16	18
23	SIN LESION		84		42	9	30	1

Agrupando a las pacientes de bajo riesgo, se dividieron en; 14 (61%) con un solo genotipo. 8 (35%) pacientes con 2 y 1(4%) con 3 genotipos. Figura 18

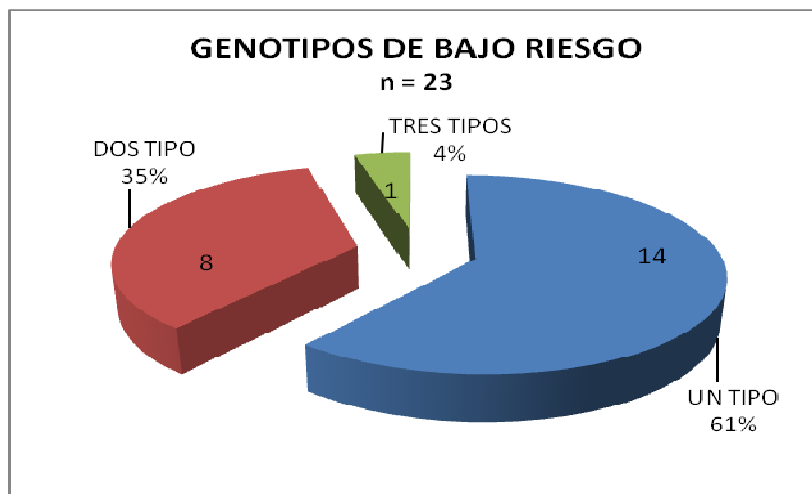


Figura 18. Numero de genotipos de bajo riesgo identificados en 23 pacientes con VPH

Los genotipos que se identificaron en el grupo de 14 pacientes que sólo tenía un genotipo de bajo riesgo fueron el genotipo 6 en 8 (57%) de ellas, el genotipo 53 en 3 (21.4%), en las 3 pacientes restantes se determinaron en cada caso los genotipos 55, 61 y 84. (7.2%) para cada paciente.

En dos de las 9 pacientes en donde se detectó 2 o 3 genotipos, la combinación más frecuente fue la de genotipos 6 y 6108, la distribución de genotipos en las 23 pacientes del grupo de bajo riesgo, se muestra en la figura 19

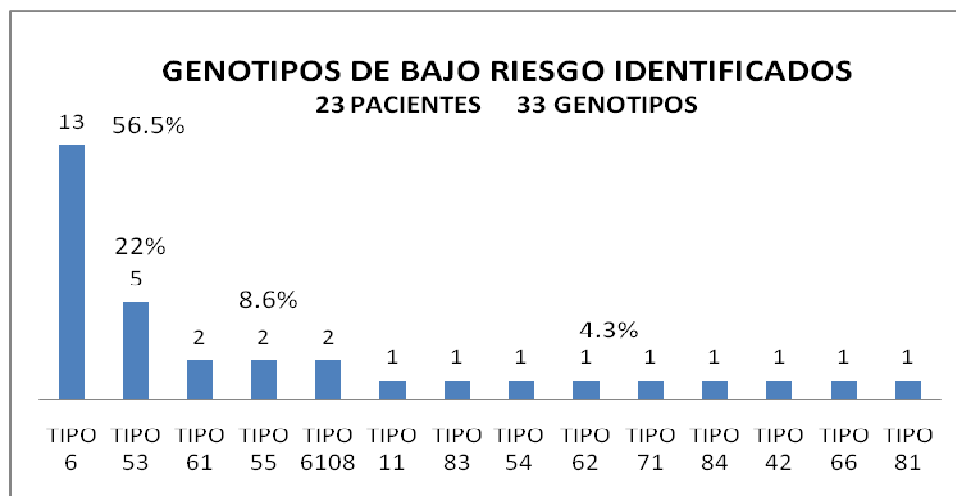


Figura 19. Genotipos de bajo riesgo identificados en 23 pacientes con VPH.

De los pacientes donde se identificaron genotipos de bajo riesgo en 14 de ellas (61%) estuvieron relacionados a condilomatosis vulvar o anal, 7(30%) presentaron lesiones tipo LIEBG y NIC y 2 (9%) no tuvieron lesiones en el área genital. Figura 20

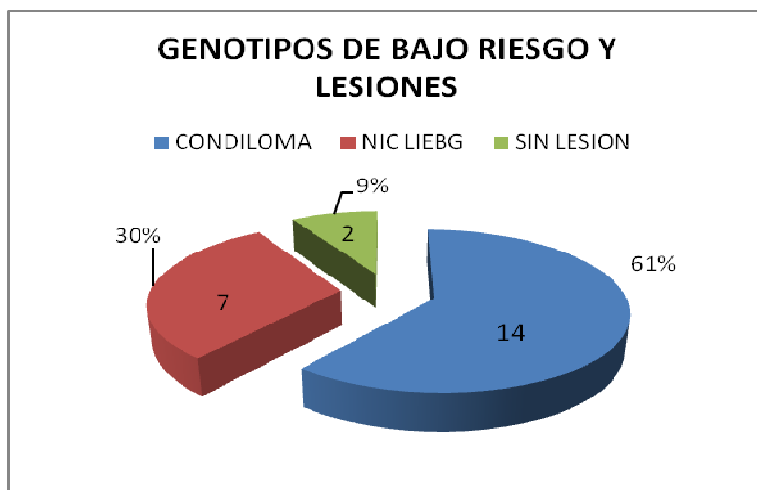


Figura 20. Tipo de lesión presente en pacientes en donde se aisló genotipos de bajo riesgo.

Tabla 5. Características de 13 pacientes en donde se identificó el genotipo 6 sólo o en combinación con otros de bajo riesgo

CASO	LESIONES	GENOTIPOS IDENTIFICADOS		EDAD	AÑOS DE ESTUDIO	IVSA	PS	
1	CONDILOMA MIXTO	6		18	9	15	3	
2	CONDILOMA MIXTO	6		22	9	18	3	
3	CONDILOMA MIXTO	6		33	9	23	1	
4	CONDILOMA MIXTO	6		46	6	22	5	
5	CONDILOMA VULVAR	6	6108	30	12	30	1	
6	CONDILOMA VULVAR	6	6108	35	9	20	1	
7	CONDILOMA VULVAR	6		53	26	22	2	
8	CONDILOMA VULVAR	6		15	6	13	2	
9	CONDILOMA VULVAR	6		35	12	17	6	
10	LIEBG	6		26	9	15	1	
11	LIEBG	6		37	12	18	3	
12	NIC I	6	55	17	12	17	1	
13	SIN LESION	6	62	81	23	9	16	18

En la tabla 5 puede observarse que 9 de las 14 pacientes con genotipo 6 (65%) presentaron condilomas, 5 de tipo vulvar y 4 tanto en región vulvar como anal, 2 pacientes (15%) tenían LIEBG, una NIC I y finalmente una paciente en donde al momento de la revisión no presentaba lesiones.

Analizando el perfil socioeconómico de las pacientes que presentaron el genotipo 6, se observa que su escolaridad tenía un nivel mínimo de secundaria en 11 de 13 (85%), 7 (54%) manifestaban 1 o 2 parejas sexuales, 6 (46%) eran mayores de 30 años.

Tabla 6. Características de 5 pacientes en donde se identificó al genotipo 53 sólo o en combinación con otros genotipos de bajo riesgo de VPH.

CASO	LESIONES	GENOTIPOS IDENTIFICADOS		EDAD	AÑOS DE ESTUDIO	IVSA	PS
		6	53				
1	CONDILOMA VULVAR	6	53	26	12	22	2
2	LIEBG	83	53	22	12	20	1
3	CONDILOMA VULVAR		53	36	9	22	3
4	CONDILOMA VULVAR		53	21	9	17	3
5	NIC I		53	24	9	19	2

En las pacientes en donde se detectó el genotipo 53, 3 de ellas presentaban condiloma vulvar, una LIEBG y otra NIC, todas tenían estudios de educación media y media superior y su edad varió entre 21 36 años.

Tabla 7. Descripción de 13 pacientes en donde se identificaron genotipos de alto riesgo (GAR).

CASO	LESIONES	TIPO DE GENOTIPOS	GENOTIPOS IDENTIFICADOS			EDAD	AÑOS DE ESTUDIO	IVSA	PS	
1	CONDILOMA ANAL	MIXTA		84	42	31	26	9	18	20
2	CONDILOMA ANAL	SOLO ALTO	16		35		24	12	14	20
3	CONDILOMA MIXTO	MIXTA	6	18			27	16	21	3
4	CONDILOMA MIXTO	MIXTA	6	52	66	58	15	9	14	1
5	CONDILOMA VULVAR	MIXTA	6	39			21	16	15	2
6	CONDILOMA VULVAR	MIXTA	11	33			25	12	15	1
7	CONDILOMA VULVAR	MIXTA	11	51			45	6	20	2
8	CONDILOMA VULVAR	MIXTA	16	51	53		15	9	14	3
9	CONDILOMA VULVAR	MIXTA	40	56			25	6	24	1
10	CONDILOMA VULVAR	MIXTA		52	42		36	16	30	4
11	LIEBG	SOLO ALTO		52		58	30	12	17	5
12	NIC I	MIXTA	11	51	42	31	19	12	16	4
13	NIC I	SOLO ALTO		52	35		34	12	30	1

*** Los cuadros sombreados indican genotipos de alto riesgo.

En el grupo de alto riesgo, se incluyeron 13 pacientes, Tabla 7, en 3 de ellas sólo se identificaron genotipos de alto riesgo, mientras que en las diez restantes se obtuvo combinación de genotipos de alto y bajo riesgo,

Las tres pacientes que presentaron solo genotipos de alto riesgo incluyeron los genotipos 52 o 35, una de ellas presentó la combinación 16 y 35, otra 35 y 52 y la tercera 52 y 58.

De las pacientes con genotipos de alto riesgo, en 9 (69%) se detectaron 2 genotipos, encontrándose 2 pacientes con 3 y 2 pacientes con 4 genotipos. Figura 21.

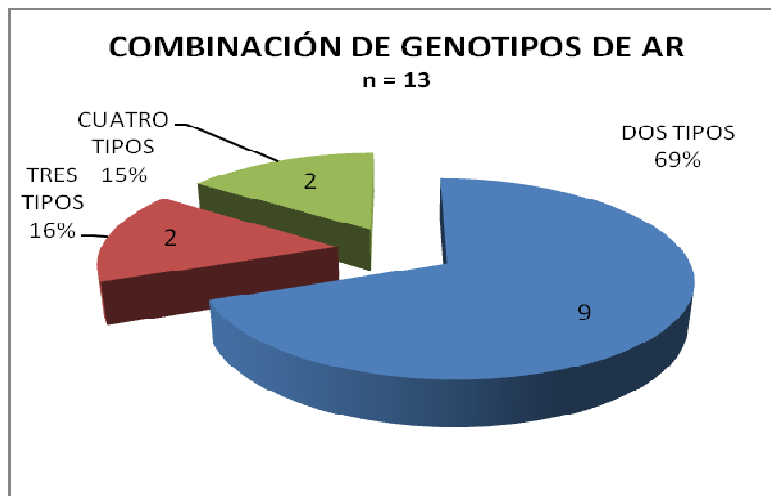


Figura 21. Numero de genotipos aislados en 13 pacientes con VPH de alto riesgo.

Los genotipos de alto riesgo encontrados en estas 13 pacientes se muestran en la figura 22. Puede observarse que en 4 (31%) se identifico el genotipo 52, mientras que el 51 se detecto en 3 (23%), los genotipos 16, 31, 35, y 58 se detectaron en 2 pacientes cada uno (15%), los restantes genotipos de alto riesgo fueron 18, 33, 39 y 55 uno en cada paciente. Trece genotipos de bajo riesgo estuvieron presentes en diez de las pacientes de alto riesgo, Tabla 7.

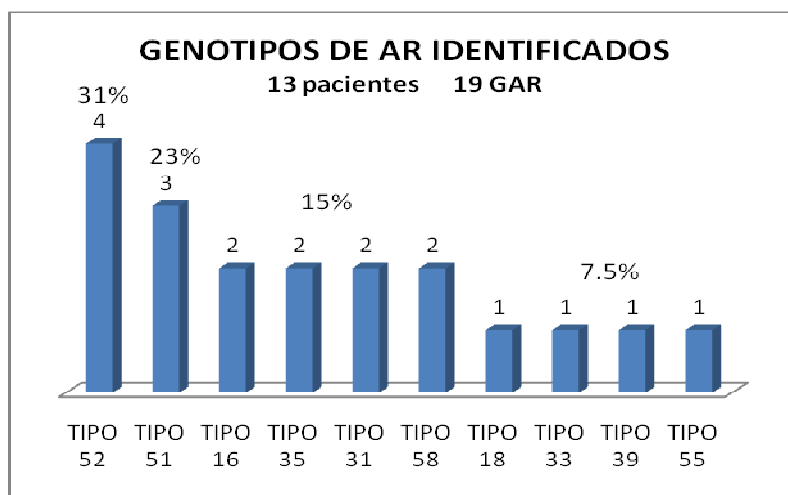


Figura 22. Genotipos de alto riesgo detectados en 13 pacientes con VPH

En 10 (77%) de las pacientes se encontraron condilomas, 2 con condilomatosis anal, 6 con vulvar y 2 con condilomatosis mixta. Dos pacientes presentaron lesiones NIC I y una tipo LIEBG.

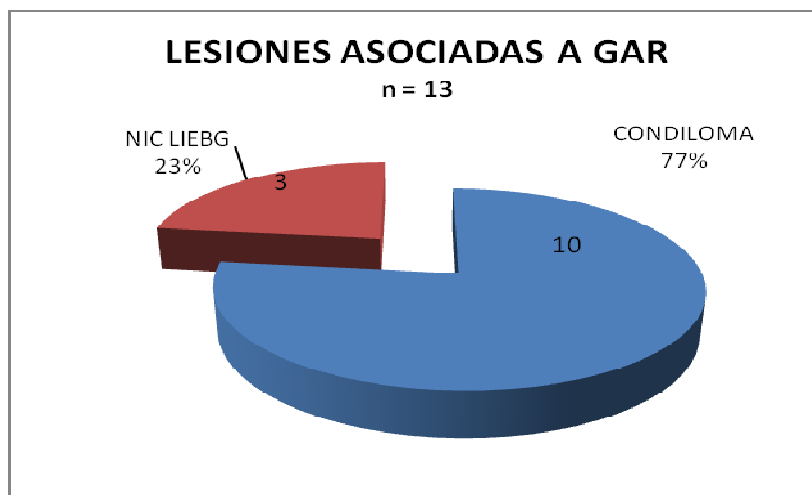


Figura 23. Tipo de lesión encontrada en 13 pacientes en donde se identificaron genotipos de alto riesgo de VPH.

Los genotipos de alto riesgo que predominaron en nuestra población en estudio fueron el genotipo 52 en cuatro (31%) pacientes y el 51 en tres (23%) de las trece pacientes.

Tabla 8. Características de 4 pacientes que presentaron el genotipo 52 de AR.

CASO	LESIONES	TIPO DE GENOTIPOS	GENOTIPOS IDENTIFICADOS			EDAD	AÑOS DE ESTUDIO	IVSA	PS	
1	NIC I	SOLO ALTO	52	35		34	12	30	1	
2	LEIBG	SOLO ALTO	52		58	30	12	17	5	
3	CONDILOMA VULVAR	MIXTA	52	42		36	16	30	4	
4	CONDILOMA MIXTO	MIXTA	6	52	66	58	15	9	14	1

*** Los cuadros sombreados indican genotipos de alto riesgo.

En la tabla 8 podemos apreciar que el genotipo 52 estuvo presente en lesiones NIC I, LIEBG, condiloma vulvar y condiloma mixto. Se asoció en dos casos con genotipos de bajo riesgo y en los dos restantes con otro genotipo de alto riesgo. La edad de las pacientes fue una de 15 años y 3 entre 30 y 34 años. La escolaridad excluyendo a la adolescente fue de media superior y superior. Dos de las pacientes tuvieron más de tres parejas sexuales. Y dos de ellas iniciaron su vida sexual antes de los 18 años.

Tabla 9. Características de las pacientes con genotipo 51 de AR.

CASO	LESIONES	TIPO DE GENOTIPOS	GENOTIPOS IDENTIFICADOS				EDAD	AÑOS DE ESTUDIO	IVSA	PS
1	CONDILOMA VULVAR	MIXTA	11	51			45	6	20	2
2	CONDILOMA VULVAR	MIXTA	16	51	53		15	9	14	3
3	NIC I	MIXTA	11	51	42	31	19	12	16	4

*** Los cuadros sombreados indican genotipos de alto riesgo.

En la tabla 9 observamos que una de las pacientes presentaban lesiones NIC I, y las otras dos condiloma vulvar. Las tres pacientes estaban asociadas con uno o dos genotipos de bajo riesgo y dos de ellas adicionalmente portaban otro genotipo de alto riesgo, específicamente la paciente con NIC I presenta 4 genotipos, 2 de BR y 2 de AR.

Su edad varió entre 15 y 45 años, su escolaridad desde primaria a media superior, su IVSA entre 14 a 20 años, el número de parejas sexuales fue de 2 y 3 para condilomas y 4 para el caso de NIC I.

DISCUSIÓN.

En pocos años la evolución tecnológica a permitido la identificación de particular virales de VPH y la asociación con patologías cervicales, demostrándose casi en un 90% como factor etiopatogénico de esta forma se establece una etiología propiamente infecciosa para un proceso oncológico, en cifras se a establecido casi el 15% de prevalencia de ADN de VPH en las lesiones, los genotipos virales frecuentemente asociados al grupo de alto riesgo son VPH 16,18,45 y 56 asociándose a carcinomas, los subtipos de riesgo intermedio son 31,33,35,51 y 52 asociándose a todos los NIC, los genotipos de bajo riesgo son 6,11,34,42,43,44 detectados e todas las lesiones benignas. En la mayoría de los casos las infecciones por VPH son subclínicas y es difícil detectarlas por examen citológico o histopatológico por esta razón los métodos moleculares como la PCR son recomendadas para tamizaje para identificación de los genotipos virales. Melo y col. Utilizando sistemas de PCR reportan VPH detectado en 81% de todos los casos y 93.5% de los canceres, la técnica permite separar en 2 grupos a los genotipos los de alto riesgo (AR) y bajo riesgo (BR) observándose en su estudio un predominio de AR en un 80.9%, la detección de infección mixta AR y BR se reporto en 5 de 9 casos y un 58% de casos de VPH positivas con citología normal lo fueron para VPH de AR, esto considerándose que se trate de una infección latente donde no es posible apreciar los cambios histopatológicos que causen la infección viral en la fase reproductiva , en este estudio se comenta que en Europa, Norte America y Australia el VPH 16 se encuentra en un 45.9% el VPH fue encontrado en un 10 a 14%, los genotipos 45 en un 2-8% ,VPH 31 en un 2-7% y VPH 33 en un 2-5%, sin embargo en así los genotipos mas frecuentemente aislados son VPH 52 y 58.La cruz y colaboradores reportan a los VPH 16, 18,31 y 33 mas frecuentemente implicados en las lesiones de BR y AR, VPH 16 en un 39%, comentándose en su estudio que no tuvieron aislamiento de VPH 18. Carrillo y col. en su estudio el genotipo 16 de mayor frecuencia y que pudo ser observado en diagnósticos de CACU.

El propósito principal de este estudio a sido determinar los tipos de VPH que estuviera asociado o no a lesiones en nuestro hospital y encontrar el tipo viral de mayor predominio en nuestra muestra, nuestro estudio incluyo muestras de 65 mujeres ginecológicas y obstétricas, un 26% de las pacientes con asilamiento se encontró en el nivel de educación media superior, de las pacientes identificadas con genotipos contaban con mas de 2 parejas sexuales, predominando inicio de vida sexual activa entre los 18 y 25 años.

En nuestra muestra el genotipo viral mas frecuentemente identificado fue el genotipo 6, el cual se asocio a 3 pacientes, 4 de ellas mostró citología relacionada con LIEBG y una de ella se reporto NIC 1 y cuyas pacientes referían condilomatosis vulvar y anal. De los casos con aislamientos mixtos que incluían genotipos de alto y bajo riesgo. Se identificaron las siguientes combinaciones con alteraciones descritas en su citología, podemos mencionar las combinaciones que se reportaron como LIEBG : 1 paciente para 6 y 6108, 1 paciente con los genotipos 6 y 55 , 1 paciente con genotipos 53 y 83,1 caso con genotipos 61 y 72, un caso con los genotipos 11,31, 52, 41 en la cual su citología reporto NIC I,

si bien estas pacientes tuvieron infección mixta con genotipos de BR, también identificamos pacientes que cursaron con infección mixta pero implicaron 1 genotipo de AR, 1 paciente con genotipos 35 y 52 reportada con NICI, 1 pacientes con citología reportadas como LIEBG cuyos genotipos encontrados fueron 52 y 58. Tuvimos pacientes con diagnósticos de NIC II y carcinomas sin embargo en estas muestras no se obtuvieron aislamientos posiblemente esto se deba a que la cantidad de células obtenidas con la toma del exudado cervicovaginal no fue representativa de la zona del endocervix, en nuestros casos pudimos observar la identificación de genotipos de alto riesgo en todo tipo de lesiones y cuyas citologías fueron reportadas normales, tal es el caso de combinaciones 6 y 39,11 y 51,11 y 33,,16,51 y 53,40 y 56,42 y 52. No tuvimos aislamientos oncogénicos de alto riesgo 16 y 18 como aislamiento únicos, solo las identificamos en infecciones mixtas y cuyas citologías se reportaron normales sin embargo estas relaciones se catalogan en base al virus de mayor riesgo.

Al compararlo con la literatura tuvimos resultados muy similares en relación a genotipos de BR como infecciones únicas que se relacionan a lesiones de bajo grado y con lesiones clínicas a nivel de vulva y ano, de igual forma pudimos observar la identificación de genotipos de AR Y BR que como se comenta en la literatura, se relacionan a lesiones de bajo grado y NIC, los resultados de nuestra estudio muestra similitud con el estudio realizado por Constance y col. En el cual se relaciona a los genotipos 6, 11 con lesiones genitales. Por lo tanto el presente estudio permitió conocer la identificación de genotipos tanto de AR Y BR cuyas citologías en muchas ocasiones se reportan negativas, por lo que sugiere que se debe considerar la técnica de PCR como un método complementar. La detección precoz recomienda un tratamiento inmediato de todas las lesiones intraepiteliales cervicales, la mayoría de las cuales presenta infección por VPH. La detección temprana de VPH estaría indicada en la citología en pacientes con resultados atípicos sospechosos pero no diagnósticos de displasia, la presencia de virus de AR permitiría priorizar recursos para un seguimiento más estricto e incluso tratamiento. (10, 33, 34, 35, 41,42).

CONCLUSIONES:

Nuestros genotipos mas frecuentes fueron 6, 11 y 53.

Se identificaron genotipos de alto riesgo en infecciones mixtas con citologías reportadas negativas y con lesiones vaginales en pacientes 16, 33, 39,51, 52,56.

Predominaron genotipos de BR los cuales estuvieron asociados a cuadro clínico genital de la paciente y a lesiones de bajo grado y NIC.

No correlacionamos genotipos de AR con lesiones de alto grado.

BIBLIOGRAFIA:

1. Bonezz W, Reichman RC. Papilomavirus. En: Mandel GL, Benett JE, Dolin R (eds): Enfermedades infecciosas. Principios y prácticas. 6ta edición. España, Elsevier, 2006:1841-51.
2. Casanova G. Infecciones por virus del papiloma humano. En: Casanova G, Ortiz F, Reyna J: Infecciones de transmisión sexual. 1ª. Edición. México, Alfil, 2004:49-68.
3. <http://www.promedicum.com> (12.08.09 20:46). Kumar. Pathologic Basis of Disease, Professional Edition , 8th ed.; Chapter 7 Neoplasia de tracto genital.
4. <http://www.promedicum.com> (12.08.09 14:22). Katz, Comprehensive Gynecology, 5th ed. Chapter 28, Intraepithelial Neoplasia of the Lower Genital Tract.
5. <http://www.promedicum.com> (12.011.09 17:35). Long, Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases, 3rd ed, CHAPTER 211 - Human Papillomaviruses.
6. <http://www.promedicum.com> (2.01.10 21:50) Rakel: Integrative Medicine, 2nd ed.; chapter 74 - Human Papillomavirus.
7. Premoli G, González A, Villareal J, Aguilera L. Virus del papiloma humano visión actual en biomedicina. ADM 2005; 52(6):213-24.
8. Rivera R, Delgado J, Painel V, Barrero R, Larrain A. Mecanismos de infección y transformación neoplásicas producido por el virus del papiloma humano en el epitelio cervical. Rev Chil Obstet Ginecol 2006; 71(2):135-39.
9. Sánchez J, Huerta M, Rivera J, Rosales M. Infección por virus del VPH y cáncer cérvico uterino. Rev Méx Patol Clin 2005; 52(4):222-33.
10. Muñoz N, Bosch X. Cervical cáncer and human papillomavirus epidemiological evidence and perspectivas for prevention. Salud Pública Méx 1997; 39:274-81.
11. Ponce S. Cáncer de cérvix. ¿Enfermedad oncológica o enfermedad infecciosa? Prog Obstet Ginecol 2001; 44:285-323.
12. Winer R, Kuang L, Hugues J, Adan D, Kiviat N, Koutsky L. Genital Human pipillomavirus infection: Incidence and risk factors in a cohort of female university students. Am J Epidemiol 2003 157 (3); 218.226.
13. Montoya R, Ramírez M, Moran M, Gallegos A, Flores M, Sánchez C. Detección de papilomavirus humano tipos 16, 18, 35 y 58 en cáncer cervicouterino y

- lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado en el occidente de México: correlación clínico-molecular. *Ginecol Obstet Méx* 2001; 69 (4):137-42.
14. Hernández C, Smith J, Lorincz A, Lazcano E, Hernández M, Salmerón J. High risk papillomavirus detection and related risk factors among pregnant and nonpregnant women in México. *Sex Trans Dis* 2005; 32(10): 613-618.
 15. Bosch FX. Epidemiología de las infecciones por el virus del papiloma humano: nuevas opciones para la prevención del cáncer cervicouterino. En: Hernández AM, Lazcano PE, Alonso RP (eds). *Cáncer cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control*. México, Médica Panamericana, 2005:203-218.
 16. Toroella K. HPV prevalence among mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecol Oncol* 1998; 70:115-20.
 17. Novoa A, Echegollen A. Epidemiología del cáncer de cérvix en Latinoamérica. *Ginecol Obstet Méx* 2001; 69(6):243-46.
 18. Rivera R, Aguilera J, Larrain A. Epidemiología del VPH. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2002; 67:501-06.
 19. Ramírez J, Díaz M, Yerena C, Ortiz R, Prevalencia del virus de papiloma humano de alto riesgo tpo 52 y 66, en muestras endocervicales de población clínicamente sana con Papanicolaou normal, de la ciudad de Xalapa, Ver., México. , *Rev Fac Med UNAM* 2009 34 (2); 34,101.
 20. Sánchez M, Uribe F, Conde C. La Infección por VPH un posible marcador biológico de comportamiento sexual en estudiantes universitarios. *Salud Pública Méx* 2002; 44:1-9.
 21. La Cruz P, Nomenclatura de las lesiones Cervicales, *Rev. Esp Patol* 2001; 36:1-7.
 22. Salomon D, Davey D, Kurman R, O'connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, et al. Bethesda system. *JAMA* 2002; 287(21): 14-19.
 23. Herrera H, Restrepo P. El virus del papiloma humano y su relación con la neoplasia cervical humana. *Rev Esp Patol* 2002; 3: 51-62
 24. Wright T, Stewart L, Dunton C, Spitzer M, Wilkinson E, Salomon D. 2006 Consensus guidelines for the Management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. *J low Genit Tract Dis* 2007; 11(4): 223-239.
 25. Trejo O, Tolentino J, Gómez J, López J, García M. Clasificación por etapas de los condilomas acuminados de la vulva y el tracto anogenital. Una Nueva Propuesta. *Rev Fac Med UNAM* 2007; 50 (4):155-57.

26. Muñoz N, Bosch X, San José S, Herrero R, Castellsagué X, Shan K, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348 (6): 518-27.
27. Palacio J, Bruno C, Pesarasi M, Hermsdoerfer S, Gil A. Infección por virus del papiloma humano. *Obstet Ginecol* 2001; 44:289-323.
28. Castellanos M. El virus del papiloma humano y el cáncer cervicouterino. *Rev Fac Med UNAM* 2004; 47 (1): 35-36.
29. Nobbenuis M, Brule V, Rosendal L. Primary screening for high risk HPV by home obtained cervicovaginal lavage is an alternative screening tool for unscreened women. *J Clin Path* 2000; 55:435-39.
30. Coloma F, Terradez J, Lloret A, Diago J, Costa S, Rodenas J, Gilabert M. Seguimiento de las pacientes con SIL. *Rev Esp Ginecol Obstet* 2003; 23:57-64.
31. Mosiki L. VPH y la mujer adolescente. *HPV today* 2004; 5:41-5.
32. Madrigal M, Ruiz M, Palacios J. Neoplasia intraepitelial de la vulva. *Ginecol Obstet Méx* 2005; 73:573-78.
33. Lacruz C, Di Martino B, Alvarez E. Incidencia de los diferentes tipos de papiloma virus humano (HPV) en las lesiones escamosas del cérvix. *Rev Esp Patol* 2003; 36 (1): 79-84.
34. Mendoza J, Muñoz M, Vielma S, Noguera M, López M, Toro M. Infección cervical por el virus del papiloma humano. *Rev Obstet Ginecol Venez* 2000; 60 (2):103-07.
35. Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Frías M, Solorza G, Lizano M. Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. *Salud Pública Méx* 2004; 46(1):1-7.
36. Soler M, Blumenthal P. New technologies in cervical cancer precursor detection. *Curr Opin Oncol* 2000; 12:460-65.
37. Whith T, Schiffman M, Salomon D, Thomas J, García F, Hatch K. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol* 2004; 103(2):304-09.
38. Rivero J. Importancia de la tipificación del VPH. *Rev Venez Oncol* 2002;14:175-77.

39. Curiel J, Lozada R, Berumen J, Briones J, Catarino A. Detección citológica de virus del papiloma humano y su correlación con PCR. *Rev Mex Patol* 1999; 46(2):74-78.
40. Negri G, Rigo B, Egarter E, Mian C. Human papillomavirus typing with hybrid capture II on archived liquid-based cytologic specimens. *Am J Clin Pathol* 2004; 122(1): 90-93.
41. Constance M, Hughes J, Kiviat N, Kuypers J, Lee Shu , Adam D, et. al. Clinical findings among young women with genital human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188:677-84.
42. Melo A, Montenegro S, Hooper T, Capurro I, Roa I. Tipificación del virus del papiloma humano en lesiones preneoplásicas y carcinoma en Chile. *Rev Med Chil* 2003; 131:1382-90.
43. Sota M. Técnicas para la determinación del VPH. *Microbiología Molecular* 2003; 11:39-49.