



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

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

**“Determinacion de la expresion del canal oncogenico Eag1 y del virus del paipiloma humano en citologias cervicales de mujeres embarazadas”.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALIDAD EN  
GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA**

**PRESENTA**

**José de Jesús González Juárez.**

**TUTOR : Dra. Luz María Hinojosa Garcia.**



**MÉXICO, D.F.**

**JULIO 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.

**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 de la Dra. Luz Maria Hinojosa Garcia.**

**Este trabajo de Tesis con No. DEDI/212/2010, presentado por el alumno José de Jesús González Juárez se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis Dra. Luz María Hinojosa García, y la Dirección de Enseñanza e Investigación a cargo del Dr. Octavio Sierra Martínez, con fecha 31 de Julio del 2010 para su impresión final**

**Dirección de enseñanza e investigación  
Dr. Octavio Sierra Martínez**

**Tutor Principal  
Dra. Luz María Hinojosa García**

## **Autorizaciones**

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

---

**Dra. Maria Elisa Vega Memije**  
**Subdirectora de Investigación**  
**Hospital General “Dr. Manuel Gea González”**

---

**Dr. Gerardo Lara Figueroa**  
**Titular del Curso de Postgrado de la División de Ginecología y Obstetricia**  
**Hospital General “Dr. Manuel Gea González”**

---

**Dra. Luz María Hinojosa García**  
**Medico Adscrito al servicio de Ginecología y Obstetricia y Displasias.**  
**Hospital General “Dr. Manuel Gea González”**

---

**“Determinación de la expresión del canal oncogenico Eag1 y del virus del papiloma humano en citologías cervicales de mujeres embarazadas”.**

**Colaboradores:**

**Dr. Samuel Weingerz Mehl**  
**Medico Ginecólogo Obstetra. Bioeticista.**  
**División de Bioética. Hospital General Dr. Manuel Gea González**

**Dra. Marcela Lizano Soberón. Investigador en ciencias medicas “E”.**  
**Departamento de Investigación. Instituto Nacional de Cancerología-Instituto de Investigaciones Biomédicas.**

**QFB. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez. Estudiante de Maestría**  
**Departamento de Farmacología. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. (CINVESTAV)**

## **AGRADECIMIENTOS.**

**Gracias Dios por permitirme llegar hasta el lugar en donde estoy, se que aun falta mucho por recorrer, se que es difícil y largo el camino, se que esta lleno de muchas dificultades y en algunas ocasiones de grandes caídas, sin embargo Tu me has apoyado y enseñado que teniendo empeño y ganas de seguir adelante, todo lo que uno se propone en esta vida se puede lograr.**

**Agradezco a mis Abuelitos (q.e.p.d) quienes se que desde el cielo me cuidan y orientan para lograr ser una mejor persona, gracias Abuelitos por estar siempre en las buenas y en la malas, Gracias por que se, que nunca me van a dejar solo principalmente en los momentos mas difíciles.**

**Gracias Pa´, por que en todos los momentos mas difíciles has estado ahí, apoyándome y orientándome a lograr mis objetivos, se que no hay forma de pagarte todo lo que has hecho por Mi, estoy eternamente agradecido porque siempre creíste en Mi, y ahora te dedico el resultado de tu esfuerzo y apoyo, mi Especialidad.**

**Gracias Ma´ porque has hecho de Mi, lo que hasta el día de hoy soy, gracias por tus regaños, gracias por tus consejos, gracias a Dios porque me dio una Madre, que se preocupo y me apoyo cuando mas lo necesite, que me hizo salir adelante cuando dude de mis capacidades, que vio en mi una persona con ganas de triunfar y salir adelante, hoy Ma´, te dedico este trabajo, se que aun faltan mas triunfos, Dios quiera y se que vas a estar ahí junto con mi Pa, para ser participe de ellos.**

**Gracias Hermanos, por su apoyo incondicional en los momentos en que los he requerido, se que falta mucho camino por avanzar, les dedico esta Tesis en agradecimiento a todo lo que me han brindado, a seguir adelante Hermanos, que Yo se que vienen grandes cosas.**

**Gracias a mis Adscritos, los cuales cada uno de Ellos, han inculcado grandes cosas en Mi, gracias por su paciencia, y ganas de enseñar a cada uno de Nosotros, no es fácil esa gran labor que hacen cada uno de Ustedes, es por ello, que les estoy eternamente agradecido.**

**Gracias Amigos (Hectorin, Fer, Peter, Gabriel, Ricky) porque me siento afortunado de contar con su amistad, Gracias al G6, y sobre todo a nuestro Angelito Elías, que desde allá arriba sigues cuidándonos, Gracias Totales...**

Gracias a mi Manada (Foggy, Gigi, Mau, Cordero), se logro un gran equipo de trabajo, y que a la par, logro grandes éxitos, así como a las amistades que se dieron durante mi formación como Especialista (Polo, Elsa, Eric, Ari) pero sobre todo agradezco el poder contar con una gran amistad que se que nunca se perderá.

Gracias a Ti, Celina quien de un tiempo a la fecha te has convertido en mi inspiración para seguir adelante, gracias por apoyarme incondicionalmente. Se que esto apenas comienza y espero sigas a mi lado por mucho tiempo mas.

Gracias a toda la gente que participo de forma directa e indirecta en la elaboración de esta tesis (Dra. Luz Ma. Hinojosa, Dra. Marcela Lizano, Dr. Samuel Weingerz Mehl, Ana, Adela, Betty y Jackie López Gil) sin el apoyo, ayuda y orientación, se que no lo hubiera logrado, gracias por el apoyo brindado por las diferentes instituciones que participaron (CINVESTAV, INCan y Gea), sin todos Ustedes, este sueño no se hubiera concretado. Gracias por todo.

***”Señor, tu nos das los dones, pero nos pides a cambio la fatiga”.***

## INDICE

Glosario .....	IV
Relación de figuras y tablas .....	V
Resumen .....	VI
Abstract .....	VII
1. Introducción .....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1. Generalidades.....	
3. Justificación .....	8
4. Hipótesis.....	8
5. Objetivos.....	9
5.1. Objetivo General	
5.2. Objetivos Particulares	
6. Material y Métodos .....	9
6.1. Tipo de estudio	
6.2. Ubicación temporal y espacial	
6.3. Criterios de selección de la muestra	
6.4. Variables	
6.5. Tamaño de la muestra	
6.6. Procedimiento	
6.7. Análisis estadístico	
7. Resultados.....	14
8. Discusión .....	32
9. Conclusiones .....	33
10. Bibliografía.....	34

#### **IV. GLOSARIO.**

**Canal Oncogénico.** Los canales de iones juegan un rol en la transmisión de señales eléctricas, en años recientes estos canales se han visto que se expresan en diferentes tumores, siendo el Eag1, el primer canal de potasio implicado en la oncogenesis.

**Virus del Papiloma Humano.** Parte de la familia de los Papillomaviridae, los cuales infectan el tracto genital. La infección primaria por el virus del papiloma humano se localiza en las células basales del epitelio escamoso estratificado y células metaplasicas fuera de la unión escamocolumnar.

**Citología cervical.** Muestra que se toma del cuello del cerviz con el fin de valorar el estado de las células que se exfolian del cuello cervical, con el fin de valorar si hay lesiones de tipo premalignas y/o malignas.

## **ABREVIATURAS.**

**VPH.** Virus del Papiloma Humano.

**PAP.** Papanicolaou.

**CaCu.** Cáncer cervicouterino.

**RNAm.** Acido Ribonucleico mensajero.

**NIC.** Neoplasia Intraepitelial Cervical.

**pRb.** Proteína Retinoblastoma.

**PCR.** Reacción en Cadena de Polimerasa.

## **V. RELACION DE FIGURAS Y TABLAS.**

### **TABLAS.**

**Tabla 1. Número de pacientes por trimestre.**

**Tabla 2. Numero de gestaciones por paciente.**

**Tabla 3. Antecedentes familiares de Cáncer.**

**Tabla 4. Tipos de Cáncer en la población estudiada.**

**Tabla 5. Tiempo de consumo de toxicomanías.**

**Tabla 6. Edad de la menarca.**

**Tabla 7. Inicio de vida sexual activa.**

**Tabla 8. Número de parejas sexuales.**

**Tabla 9. Parejas sexuales con circuncisión.**

**Tabla 10. Tiempo de uso de anticonceptivo hormonal.**

### **GRAFICAS.**

**Gráfica 1. Trimestres gestacionales de la población en estudio.**

**Gráfica 2. Porcentaje de gestaciones por paciente.**

**Gráfica 3. Pacientes con antecedentes positivos para Cáncer.**

**Gráfica 4. Enfermedades concomitantes.**

**Gráfica 5. Antecedentes de toxicomanías.**

**Gráfica 6. Edad de la Menarquía.**

**Gráfica 7. Inicio de vida sexual.**

**Gráfica 8. Porcentaje de parejas sexuales por paciente.**

**Gráfica 9. Pareja sexual con circuncisión.**

**Gráfica 10. Complicaciones en embarazos previos.**

**Gráfica 11. Tipos de complicaciones en embarazos anteriores.**

**Gráfica 12. Usuarios de anticonceptivo hormonal.**

**Gráfica 13. Toma de Papanicolaou previo a la gestación.**

**Gráfica 14. Resultados de Papanicolaous tomados antes del embarazo.**

**Gráfica 15. Reporte de Papanicolaou en muestras tomadas de pacientes.**

**Gráfica 16. Determinación de PCR en celulas cervicales.**

**Gráfica 17. Presencia de Eag1 en células cervicales.**

**Gráfica 18. Porcentaje de células marcadas para Eag1.**

**Gráfica 19. Intensidad de células marcadas para Eag1.**

**Gráfica 20. Correlación entre la presencia y ausencia del VPH y el nivel de expresión de Eag1**

## **VI. RESUMEN.**

Las estimaciones epidemiológicas sugieren que la prevalencia mundial de la infección por VPH es del 9% al 13%. (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).

El cáncer cervicouterino es la primera causa de muerte entre las mujeres mexicanas con cáncer, ocupando un 16.6%, siendo el cáncer de mama la primera causa de muerte en la mujer a nivel mundial seguida del cáncer cervicouterino. La mayoría de las mujeres que desarrollan este cáncer tienen entre 40 y 50 años de edad.

Más del 70% de las adolescentes sexualmente activas y mujeres jóvenes adquieren una infección por VPH. De estas, la mayoría son transitorias y solo cerca del 25% desarrollan una lesión intraepitelial de bajo grado. Después, solo del 20 a 40% de estas lesiones progresarán a lesiones intraepiteliales de alto grado. (10, 11).

Se analizaron 68 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.

La frecuencia de VPH en muestras citológicas exfoliativas de cérvix de pacientes embarazadas fue del 24%. La totalidad de las lesiones intraepileliales de bajo grado identificadas en el estudio fueron VPH positivas. Se observó expresión de Eag1 en la totalidad de las muestras citológicas VPH positivas y VPH negativas. El nivel de expresión de la proteína Eag1 fue mayor en muestras VPH positivas, evaluado como frecuencia de células marcadas por inmunocitoquímica por muestra.

## **VII. ABSTRACT.**

Epidemiological estimates suggest that the global prevalence of HPV infection is 9% to 13%. (1), estimates derived from studies of cervical smears that show the prevalence of HPV DNA determined by polymerase chain reaction or hybrid capture test women selected in several geographic areas (13.3% Ontario, Canada, 14.5% in the State of Morelos, Mexico, 16.6% in Concordia, Argentina, 15.3% in Reims, France, 41.6% in Harare, Zimbabwe, and 18% in the province Shanxi, China (2-7).

Cervical cancer is the leading cause of death among Mexican women with cancer, taking up 16.6%, breast cancer remains the leading cause of death in women worldwide followed by cervical cancer. Most women who develop this cancer are between 40 and 50 years of age.

Over 70% of sexually active adolescents and young women acquire an HPV infection. Of these, most are transient and only about 25% develop a low-grade intraepithelial lesion. Then, only 20 to 40% of these lesions progress to high-grade intraepithelial lesions. (10.11)

We analyzed 68 samples of pregnant patients that consisted of making exfoliated cervical cells. To determine the presence of virus DNA was extracted from samples and underwent a nested PCR with two sets of primers that amplify the L1 region of viral DNA. Subsequently, to determine the types present in this population, the fragments obtained were sequenced and compared to BLAST.

The frequency of HPV in cervical exfoliative cytology samples of pregnant patients was 24%. All of the low-grade lesions intraepitheliales identified in the study were HPV positive. E6/E7 expression was observed in all HPV-positive cytological samples and HPV negative. The level of protein expression was higher in E6/E7 HPV-positive samples, evaluated as frequency of labeled cells per sample immunocytochemistry.

## 1. INTRODUCCION.

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la segunda causa de neoplasias malignas en mujeres a nivel mundial y se estima que cada año ocurren 273 000 muertes por CaCu mundialmente, de los cuales el 80% de los casos corresponden a países en vías de desarrollo (8). En México, en el año 2002, se registraron 12 512 nuevos casos de CaCu, de los cuales 5 777, el 46% de los casos, fueron decesos. (9).

Casi todos los casos de cáncer de cuello uterino (99,8%) se debe a una infección con el virus del papiloma humano (VPH). El enlace entre el CaCu y el VPH fue demostrado a principios de los años 80's por el doctor Harald Zur Hausen y la infección es un requisito necesario para el desarrollo de esta enfermedad (11).

El virus del papiloma, pertenece a la familia Papillomaviridae, estos virus están ampliamente distribuidos en la naturaleza e infectan específicamente el epitelio escamoso (7). Existen más de 100 tipos de VPH, de los cuales más de 30 pueden transmitirse de una persona a otra por medio de contacto sexual. De estos los VPH tipo 16, 18, 31 y 45 causan el 80% de los cánceres cervicales diagnosticados (1,6). El 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 con una prevalencia mundial del 9% al 13% (6). Más del 80% de las mujeres sexualmente activas sufren una infección por VPH a lo largo de su vida (7).

Existen además otros factores que se asocian al desarrollo de CaCu en mujeres infectadas con VPH, por ejemplo: Inicio de vida sexual a edad temprana, múltiples compañeros sexuales, uso de anticonceptivos orales, coinfección con otros virus de transmisión sexual (herpes simplex tipo 2, citomegalovirus), trauma cervical asociado con multiparidad, fumar, la edad (CaCu es más común después de los 35 años), predisposición genética (representa el 27% del efecto de los factores subyacentes para el desarrollo del tumor) (8), así como dentro de los factores de protección, la circuncisión masculina está asociada con una reducción en la infección por VPH en pene (5). Entre estos factores de riesgo que inducen al CaCu se encuentra el uso de estrógenos (9), ya que los estrógenos incrementan la fase S del ciclo celular en el CaCu (12).

Durante el embarazo, el hallazgo de la infección por virus del papiloma humano se ha reportado hasta en un 37% con virus de alto riesgo (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 de tipo condilomas a nivel del tracto genital que pueden tener una rápida proliferación durante el embarazo en respuesta a los cambios hormonales.

En cérvix normal el canal Eag1 no se expresa, existiendo evidencia de que la expresión del RNAm y de la proteína de Eag1 en biopsias de carcinoma cervical, el canal Eag1 como marcador de cáncer cervical (13). En un estudio realizado por un grupo de investigación se determinó la expresión de la proteína Eag1 en citologías cervicales por medio de inmunocitoquímica de pacientes con cérvix normal, pacientes con lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado. Los resultados que se obtuvieron son: pacientes con cérvix normal 27 %, pacientes con lesión intraepitelial de bajo grado 62% y pacientes con lesión intraepitelial de alto grado 92% (14). Dado que Eag1 no se ha encontrado con expresión en cérvix normal, nos llevó a pensar que aquellas muestras control (cérvix normal 27%) que expresaron Eag1 en nuestro estudio podría ser indicativo de una señal temprana de displasia.

## 2. ANTECEDENTES.

El cáncer de cuello uterino constituye un problema mundial de salud, ocupando el segundo lugar entre las neoplasias malignas de la mujer. Las estadísticas demuestran que el CaCu se presenta frecuentemente en mujeres mayores de 40 años que habitan países en vía de desarrollo, en los cuales ocupa el primer lugar en mortalidad mientras que en países desarrollados se ubica en la quinta posición. 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).

Para el desarrollo de la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y de cáncer de cuello de útero debe existir una infección persistente por virus del papiloma humano (9, 11) Entre las entidades clínicas más comunes por infección de VPH de bajo grado, son las displasias del cuello uterino, las cuales suelen resolverse espontáneamente (7).

La infección por VPH conduce a displasias de moderado y alto grado del cuello uterino (NIC 2 / 3), que son inmediatas y obligar a los precursores de cáncer de células escamosas del cuello uterino, y adenocarcinoma in situ. 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 (7).

Las verrugas anogenitales (condiloma acuminata) son otra consecuencia de las infecciones por el VPH, la mayoría de estas son producidas por 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 (14, 15) 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 (15).

El riesgo de contraer un VPH genital está influenciado por diferentes factores de riesgo siendo la actividad sexual, una de los principales causas de mecanismo de transmisión.

a) 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 (16) y actividad sexual a temprana edad.

b) Antecedente de enfermedades de transmisión sexual y/o presencia de verrugas genitales

e) La infección es más común en mujeres jóvenes sexualmente activas, de 18 a 30 años de edad, disminuyendo la prevalencia, después de los 30 años. El CaCu es más común después de los 35 años, lo que sugiere infección a temprana edad y progresión lenta a cáncer. (17,18).

f) Persistencia viral. Común entre los tipos virales de alto riesgo la persistencia viral es un factor determinante en el desarrollo del CaCu. 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 con la subsecuente neotransformación maligna de las células cervicales.

g) Uso prolongado de anticonceptivos orales. La región larga de control, LCR en el genoma viral, contiene elementos de respuesta a glucocorticoides, inducidas por hormonas como la progesterona han reportado la alta positividad al DNA viral (19).

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

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

j) 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 (20).

La transmisión del VPH, se da principalmente a través de la piel, por lo cual se incluye, el coito vaginal, coito anal, sexo oral, el contacto entre mano y genitales. Dentro de las formas de transmisión no sexuales, se incluyen la transmisión vertical (madre-feto) y en menor porcentaje la transmitida a través de fomites, debido a que el virus es resistente al medio ambiente (21-23).

En la actualidad, existen aproximadamente 100 tipos de VPH (1), de los cuales una tercera parte afectara la zona anogenital, dentro de estos 15 a 20 se clasifican como oncogénicos (24) siendo el VPH 16 y 18 los agentes causales en más del 70% de los cánceres cervicales (25).

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.

El ADN del genoma del VPH se divide en una región (E), y en una región larga (L). Las proteínas E1 y E2 actúan en el control de la replicación y transcripción. La proteína E6 se asocia con el tumor supresor p53, promoviendo 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 (26), el código de L1 y L2 son para el mayor y menor de las

proteínas de la cápside del virión (27). Las proteínas de la cápside son los antígenos que sólo son accesibles ante una clásica respuesta de anticuerpos neutralizantes a HPV(28).

La infección inicial que se presenta en piel o mucosas, requiere que las partículas virales tengan acceso a las células en la capa basal, a nivel del 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. El ciclo de vida del virus está relacionado con la diferenciación de las células del epitelio escamoso estratificado.

La infección por VPH evade el sistema inmunitario innato, ya que se replica principalmente en queratinocitos diferenciados, los cuales están destinados a morir y a mantener el antígeno de la cápside L1 y L2 lejos del antígeno de presentación, localizado en las células de Langerhans y macrófagos (28).

En el epitelio escamoso estratificado normal, 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. Las proteínas E1 y E2 son de las primeras en expresarse durante el ciclo de vida del virus, actuando como factores de replicación, E2 ayuda a la transcripción viral, contribuyendo a controlar el número de copias virales en las células.

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. 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).

Tras la entrada en las capas de células suprabasal, los genes virales son expresados (30), el VPH codifica las proteínas estructurales, L1 y L2, que se permiten la amplificación del genoma viral. La expresión de las proteínas permite un ensamblaje de viriones en las capas superiores del epitelio. (28) El esparcimiento de queratinocitos muertos (parte del proceso natural del ciclo celular) y las emisiones de viriones de VPH infectan a otras células (29).

La expresión de proteínas virales E6 y E7 por la célula huésped infectada permite restablecer la progresión del ciclo celular y retardar una diferenciación terminal, aumentando así la frecuencia en la replicación de las células basales (31). El retraso de la detención del ciclo celular permite seguir en la replicación del VPH en las células del epitelio suprabasal.

La neoplasia intracervical (NIC) o lesiones intraepiteliales, se clasifican sobre la base de la magnitud de la proliferación anormal de la capa basal del epitelio cervical. En displasia leve (NIC 1) o lesión intraepitelial de bajo grado (LIEBG), 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, estos últimos se clasifican como lesión intraepitelial de alto grado (LIEHG). (32)

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.

Dentro de los métodos de diagnóstico, 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 (33):

- 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.

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 (34).

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.

#### 1. Los canales de potasio Eag1 y su participación en el desarrollo del cáncer.

Entre la diversidad de canales iónicos involucrados en cáncer, sobresalen los canales de potasio por su implicación en la proliferación celular, entre estos se encuentran dos canales de potasio que además de estar sobre-expresados en diferentes tipos de tumores, poseen propiedades oncogénicas: el canal KCNK9 y el canal éter à go-go 1 (Eag1) (35).

El canal de potasio Eag1 es uno de los más estudiados por su participación en el desarrollo del cáncer. En tejido sano el canal Eag1 se localiza principalmente en el cerebro, pero en tejidos fuera del sistema nervioso central es prácticamente indetectable, ya que solo se ha encontrado en placenta, testículo, glándula adrenal y algunas otras estructuras que presentan características proliferativas (37-40). Pero el canal Eag1 se ha encontrado expresado en varias líneas celulares tumorales (EFM-19, HeLa, MCF-7, SH-SY5Y) y tumores de diferente histogénesis, incluyendo cáncer cervical, pulmonar, mamario, colon y próstata (36,37-40), es decir, los principales cánceres que afectan a la humanidad. Además se ha observado que al transfectar el canal Eag1 a células de mamífero, se origina un fuerte fenotipo tumoral, induciendo proliferación y transformación celular. Dicho fenotipo tumoral no se presenta en células transfectadas con otro tipo de canal de potasio activado por voltaje e implantar estas células que expresan el canal Eag1 en ratones inmunosuprimidos produce tumores extremadamente agresivos y friables (36). En otras palabras, el canal Eag1 tiene las propiedades de un oncogén. Más aún, estudios recientes proponen una asociación entre la amplificación de Eag1 y la disminución en la supervivencia de pacientes con carcinoma de colon (41). La expresión restringida de Eag1 en algunos tejidos sanos y su sobre-expresión en tumores han hecho que Eag1 sea considerado como un potente marcador tumoral para diversos tipos de cánceres.

El embarazo es un estado fisiológico en el que se presenta una serie de cambios temporales en la estructura corporal de la mujer gestante, como resultado del incremento en la producción de estrógenos, progesterona, gonadotropina coriónica humana, entre otras hormonas, por parte de la placenta y el feto. Los estrógenos en el embarazo influyen en la producción de progesterona, el flujo sanguíneo útero-placentario, el desarrollo de la glándula mamaria y la función de la glándula suprarrenal fetal. Durante el embarazo los niveles de estrógenos alcanzan unas concentraciones treinta veces superiores a las que se encuentran en la fase lútea de la mujer no gestante (42).

Durante el embarazo el CaCu es detectado como enfermedad preinvasiva o en estadios tempranos, debido a que el embarazo permite la detección oportuna de estas lesiones,

contrario a lo que sucede en mujeres no embarazadas las cuales principalmente en países en desarrollo ignoran las recomendaciones de tamizaje para CaCu (43).

El embarazo es una oportunidad ideal para la realización de la toma de tamizaje para neoplasia cervical. La recomendación para la toma de Papanicolaou es en la primera visita prenatal y nuevamente a las 6 semanas postparto. Existen reportes de los cuales hay menor número de casos diagnosticados de displasia en Papanicolaou postparto que en aquellos que se toman preparto, lo cual soporta la estrategia de la toma de dicha muestra en el control prenatal (44). Existe una incidencia de Papanicolaou anormal durante el embarazo de un 5% hasta un 8% basado en un universo de población de alto riesgo. En el embarazo no es común una muestra de Papanicolaou insatisfactoria, esto debido a que durante el embarazo la zona de transformación presenta una relativa migración hacia el exocérvix (45).

### 3. JUSTIFICACION.

El canal Eag1 es una herramienta potencial para el diagnóstico y probable blanco terapéutico en diversos tipos de cánceres, por lo que es necesario estudiar su expresión asociado por aquellos factores que lo regulan, como por ejemplo, los estrógenos y el virus del VPH. El presente estudio permitirá determinar si la expresión del canal Eag1 es regulado por un ambiente hiperestrogénico natural en cérvix, como es el caso de una paciente embarazada y si una infección por VPH aumenta su sobre-expresión.

Los estrógenos son considerados como factores de riesgo para algunos tipos de cáncer (mama, endometrio, útero), por lo que estudiar la expresión de los canales Eag1 en muestras citológicas de cérvix expuestas de manera fisiológica a un ambiente hiperestrogénico, nos permitiría conocer la posible regulación estrogénica de Eag1 ya no *in vitro* sino directamente en pacientes embarazadas y puede ser de utilidad para identificar algunos factores fisiológicos que determinen la expresión de dicha proteína oncogénica en células cervicales.

Por otra parte el VPH está involucrado en la mayoría de las enfermedades pre-malignas y malignas del cérvix, se sabe que más del 80% de las mujeres sexualmente activas sufren una infección por VPH a lo largo de su vida y en las mujeres embarazadas CaCu es detectado como enfermedad preinvasiva o en estadios tempranos, debido a que el embarazo permite la detección oportuna de estas lesiones a través del estudio del Papanicolaou. Por lo tanto es de nuestro interés determinar si la presencia de una infección por el virus del VPH en pacientes embarazadas condiciona una sobre-expresión del canal oncogénico Eag1.

La expresión y activación del canal Eag1 relacionada con los procesos celulares merece estudiarse para reforzar el papel de Eag1 como un posible blanco farmacológico y terapéutico específico, ó para estandarizar un proceso de marcaje y diagnóstico temprano de tumores malignos (12). Por tal motivo es de nuestro interés estudiar la expresión del canal Eag1 en un ambiente hiperestrogénico natural (embarazo) junto con la detección de VPH.

#### **4. HIPOTESIS.**

Si los estrógenos y el VPH *in vitro* regulan la sobre-expresión de la oncoproteína Eag1 y la oncoproteína Eag1 se ha encontrado sobre-expresada en pacientes que consumen estrógenos, entonces pacientes embarazadas que se encuentren en un ambiente hiperestrogénico natural y presente una infección con VPH, sobre-expresarán la oncoproteína Eag1.

## **5. OBJETIVOS**

Objetivo general:

Determinar la expresión del canal Eag1 a nivel de proteína, por medio de inmunocitoquímica, en citologías exfoliativas de cérvix de pacientes embarazadas.

Objetivos particulares:

1. Realización de Papanicolaou en citologías de pacientes embarazadas.
2. Determinar la presencia del VPH en muestras citológicas exfoliativas de cérvix.
3. Evaluar la expresión de Eag1 en muestras citológicas exfoliativas de cérvix.
4. Correlacionar los hallazgos de las citologías cervicales de mujeres embarazadas con la expresión del oncogén Eag1 y determinación del VPH.

## **6. MATERIAL Y METODOS.**

**6.1 Tipo de estudio.** Descriptivo.

**6.2 Ubicación temporal y espacial.**

Las muestras de citología exfoliativa cervical, serán obtenidas de las pacientes embarazadas que acuden al servicio de consulta externa de obstetricia del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”.

**El estudio es Descriptivo, Abierto, Observacional, Prospectivo y Transversal.**

**6.3. Criterios de Selección de la Muestra.**

### **Criterios de Inclusión.**

- Todas las pacientes embarazadas en cualquier trimestre de su embarazo, que acuden a los servicios de Consulta externa de obstetricia.
- Que acepte participar en el estudio
- Que acepte firmar el consentimiento informado

### **Criterios de exclusión.**

- Pacientes que hayan consumido estrógenos en el último año.
- Pacientes que tengan antecedentes de algún tipo de cáncer o de tumores ginecológicos benignos.

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

#### **Criterios de eliminación.**

- Las muestras con material insuficiente para el análisis morfológico o viral.
- Las muestras con el anticuerpo precipitado al ser procesadas por inmunocitoquímica.
- Muestras contaminadas que alteren los resultados del laboratorio.
- Muestras que se hayan transportado de manera inadecuada.
- 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. <b>(CAUSA)</b>		Dependientes. <b>(EFECTO)</b>	
Variable	Escala	Variable	Escala
Edad	Intervalo	Presencia de la proteína Eag1	Cualitativa. Expresada o No
Trimestre de embarazo	Nominal 1° 2° 3°	Presencia de VPH	Dicotómica Si/No
Núm. de (embarazos, partos, abortos, cesáreas)	Intervalo	Cepa	Ordinal
Familiares con cáncer		Cepa oncogénica	Dicotómica
Enf. presentes	Nominal	Cepa no oncogénica	Dicotómica
Tabaquismo	Nominal		
Alcoholismo			
Drogadicción	Dicotómica Si/No		
Menarca			
Última menstruación			
Duración del ciclo menstrual	Nominal Nominal Nominal		
Duración de la menstruación	Intervalo		
Edad de primera relación sexual			
Num. parejas sexuales	Nominal por años		
Complicaciones en	Intervalo		

embarazos			
Se ha realizado PAP	Ordinal Preeclampsia, hipertensión, diabetes gestacional		
Fecha de ultimo PAP			
Resultados de ultimo Paps	Dicotómica Si/No  Nominal dia/mes/año Neg a Ca, displasia leve, displasia moderada o severa, virus del papiloma Cáncer cervicouterino e infección no específica		

### 6.5 Tamaño de la muestra.

Se tomaron 108 muestras a pacientes embarazadas del Hospital Dr. Manuel Gea González, durante el periodo de mayo – julio 2010, las cuales consistieron en citología exfoliativa para realización de Papanicolaou, extracción de DNA para VPH e inmunocitoquímica para determinación de la presencia de la proteína oncogénica E6 en células cervicales.

### 6.6 Procedimiento

#### Toma y procesamiento de muestras

Se tomarán dos muestras de frotis exfoliativos cervical de pacientes embarazadas, que acuden a los departamentos de citología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” siguiendo las normas éticas de la Institución.

Una de las muestras será para el estudio de Papanicolaou y la citología líquida de las inmunocitoquímicas, la otra muestra será procesada para la extracción de DNA para VPH.

#### Inmunocitoquímica

Los tubos con cytolayer se agitarán con vortex durante 50 s, se retirará el cepillo cervical y se agregarán 5 ml de la suspensión en un tubo Falcon al que previamente se le colocarán 1.5 ml de líquido de gradiente de densidad (Bio SB, cat BSB 4009) para continuar con la inmunocitoquímica (ICQ).

Las muestras se centrifugarán durante 10 min a 3000 rpm a 25° C, se eliminará el sobrenadante y el botón celular se resuspende en 1 ml de agua bidestilada por cada mm de concentrado celular agitando con vortex durante 50 s. Se colocarán laminillas cargadas en la placa de sedimentación y se agregará 1 ml de la suspensión celular, se dejan sedimentar durante 15 min, se desecha el líquido remanente y se deja secar al aire libre. Se almacenan en congelación hasta su posterior procesamiento.

Posteriormente, se realiza la recuperación antigénica inducida por calor, colocando las laminillas en una solución de EDTA 10 mM, pH 8 en una olla de presión a máxima temperatura, durante 30 min, se dejan enfriar al aire libre y posteriormente se colocan en buffer de lavado.

Se agrega 100 µl de bloqueador dual de la actividad endógena de peroxidasa (Dako, cat S2003) y se incuba durante 30 min. Se enjuagan con buffer de lavado y se agregan 100 µl del anticuerpo primario a determinar (Eag1-Ab62 1:100, ER  $\alpha$  (B644) 1/100, ER  $\beta$  (EMR02) 1/50) y se deja incubar durante 60 min.

Se enjuagan con buffer de lavado y se agregan 100 µl de anticuerpo secundario biotinilado (Ventana medical, Tucson AZ), se incuba durante 15 min, se enjuaga y posteriormente se agregan 100 µl de estreptoavidina (Ventana medical, Tucson AZ) y se incuba durante 15 min. Se enjuagan, se agregan 100 µl de diaminobencidina con 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ventana medical, Tucson AZ) y se incuban durante 4 min. Se enjuagan y finalmente se contrastan los tejidos y células agregando 100 µl de hematoxilina (Ventana medical, Tucson AZ) durante 5 min, se enjuaga y se agregan 100 µl de carbonato de litio para virar a azul el color de la hematoxilina (Ventana medical, Tucson AZ).

Las células y tejidos se deshidrataron sumergiendo de forma consecutiva en alcohol, alcohol absoluto, xilol/alcohol absoluto y xilol; se montaron con resina permanente para microscopia, entellan (merck, cat 107960) y se visualizan con un microscopio de luz para su evaluación. Se considera positivo para Eag1 cuando se presenta una coloración café (peroxidasa) en el núcleo, citoplasma y/o membrana celular. Para los receptores a estrógenos se considera positivo cuando se presenta una coloración café (peroxidasa) en el núcleo.

Las muestras se valoraran de manera cualitativa en su presencia o no de la tinción específica

#### Determinación de VPH

El ADN es extraído y purificado usando el kit QIAamp DNA Micro (Qiagen Inc., Valencia, CA) de acuerdo al protocolo del kit. Para corroborar que el ADN obtenido es de calidad y este en cantidad suficiente para la amplificación por PCR, se utilizan oligonucleótidos que amplifican un fragmento del gen B-globina. Los oligonucleótidos utilizados son GH20 y PC04 (GH20 5'- GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'; PC04 5' CAACTTCATCCACGTTCCACC-3') que amplifican un fragmento de 268pb (Resnick et al; 1990). Las condiciones de PCR son las siguientes, en 25 µl: dNTPs 0.2mM, MgCL2 4mM, GH20 1pmol, PC04 1 pmol, Taq Promega 1U. Se realizan 40 ciclos de amplificación en un termociclador Master Cycle Gradiente (EPPENDORF), cada ciclo incluye 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 es precedido por una desnaturalización de 5 min a 94°C y después del último ciclo se realiza un periodo de elongación de 7 min a 72°C, 5µl de cada uno de los productos de PCR se corren en gel de Agarosa al 1.5% para comprobar los resultados. Todas las muestras negativas para ésta reacción se excluyen de los ensayos posteriores.

#### Determinación de VPH

El ADN es extraído y purificado usando el kit QIAamp DNA Micro (Qiagen Inc., Valencia, CA) de acuerdo al protocolo del kit. Para corroborar que el ADN obtenido sea de calidad y este en cantidad suficiente para la amplificación por PCR, se utilizan oligonucleótidos que amplifican un fragmento del gen  $\beta$ -globina. Los oligonucleótidos utilizados son: GH20 y PC04 (GH20 5'- GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'; PC04 5' CAACTTCATCCACGTTACC-3') que amplifican un fragmento de 268pb del gen de  $\beta$ -globina (Resnick et al; 1990). Las condiciones de PCR son las siguientes, en 25  $\mu$ l: dNTPs 0.2mM, MgCL2 4mM, GH20 1pmol, PC04 1 pmol, Taq Promega 1U. Se realizan 40 ciclos de amplificación en un termociclador Master Cycle Gradiente (EPPENDORF), cada ciclo incluye 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 es precedido por una desnaturalización de 5 min a 94°C y después del último ciclo se realiza un periodo de elongación de 7 min a 72 °C, 5 $\mu$ l de cada uno de los productos de PCR se corren en gel de Agarosa al 1.5% para comprobar los resultados. Todas las muestras negativas para ésta reacción se excluyen de los ensayos posteriores.

### **6.7 Análisis estadístico.**

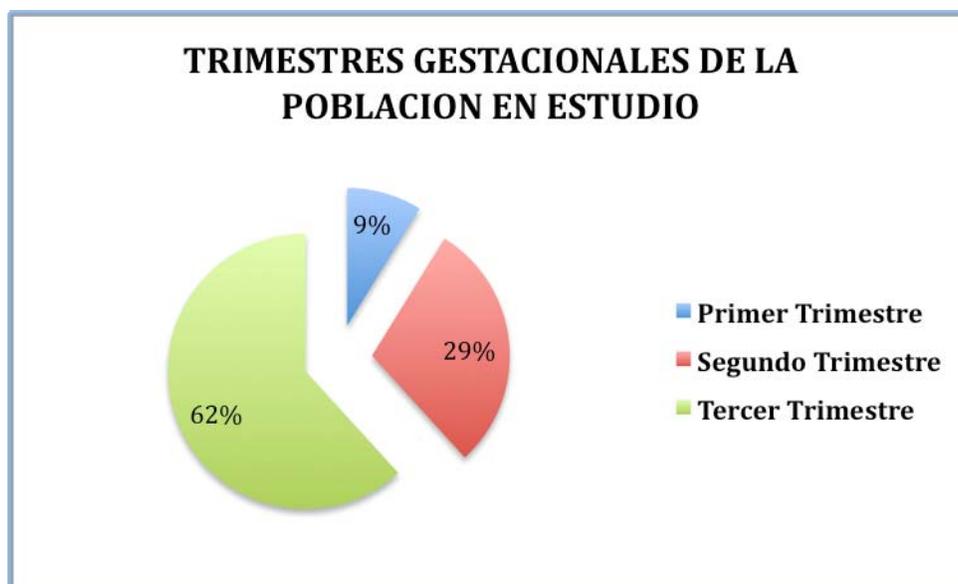
Se utilizará estadística descriptiva: medidas de tendencia central y dispersión: rango, media, mediana, moda, desviación estándar, proporciones o porcentajes.

## 7. RESULTADOS.

**Tabla 1. Numero de pacientes por trimestre.**

Primer Trimestre	Segundo Trimestre	Tercer Trimestre
8.82%	29.41%	61.76%
6 pacientes	20 pacientes	42 pacientes

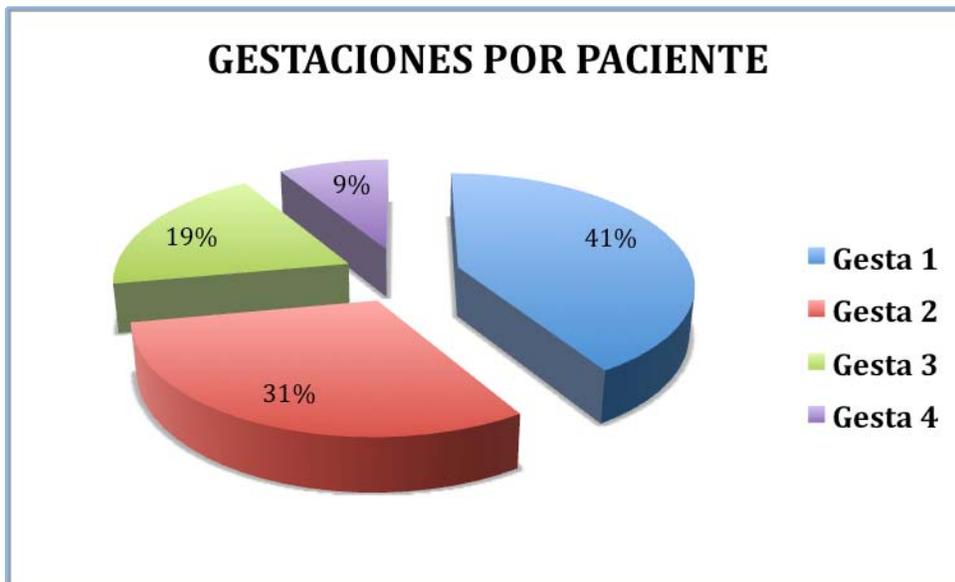
**Grafica1. Trimestres de Gestación en la Población estudiada.**



**Tabla 2. Gestaciones por paciente.**

No. de Gestaciones	Población	
	Número de Pacientes	Población (%)
1	28	41.17
2	21	30.88
3	13	19.11
4	6	8.82

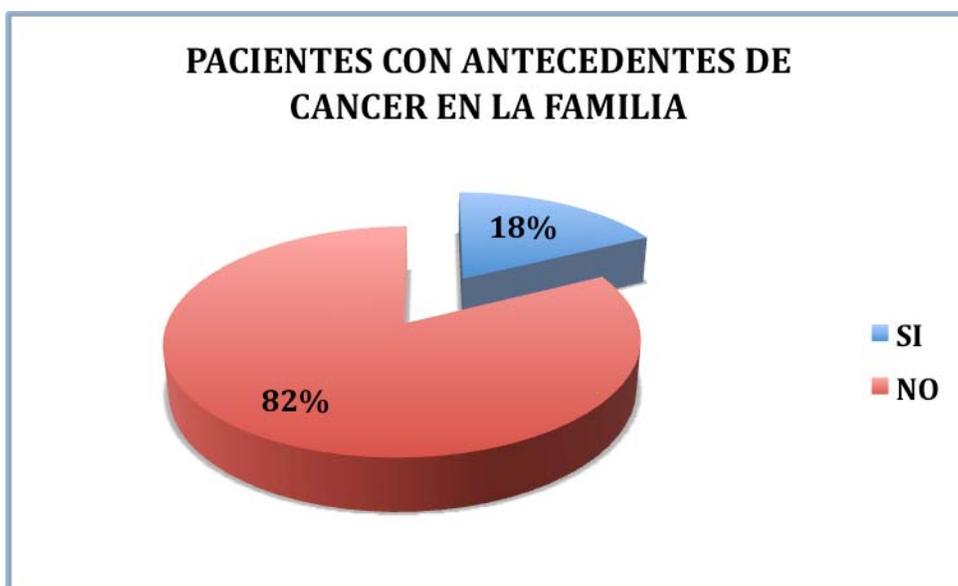
**Grafica 2. Porcentaje de Gestaciones por paciente.**



**Tabla 3. Antecedentes familiares de Cáncer.**

Si	No	Total de Pacientes
12	56	68

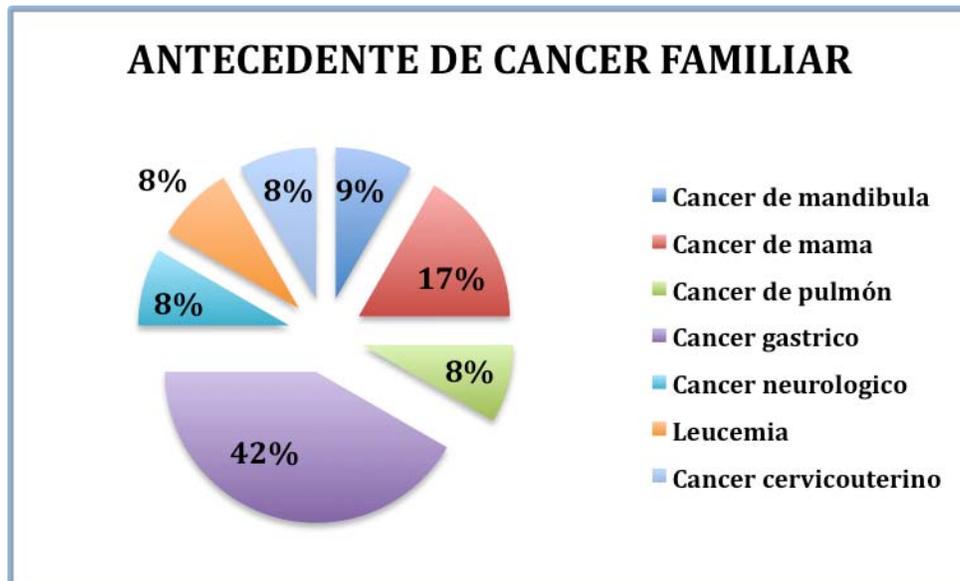
**Grafica 3. Pacientes con antecedentes positivos para Cáncer.**



**Tabla 4. Tipos de Cáncer en la población estudiada.**

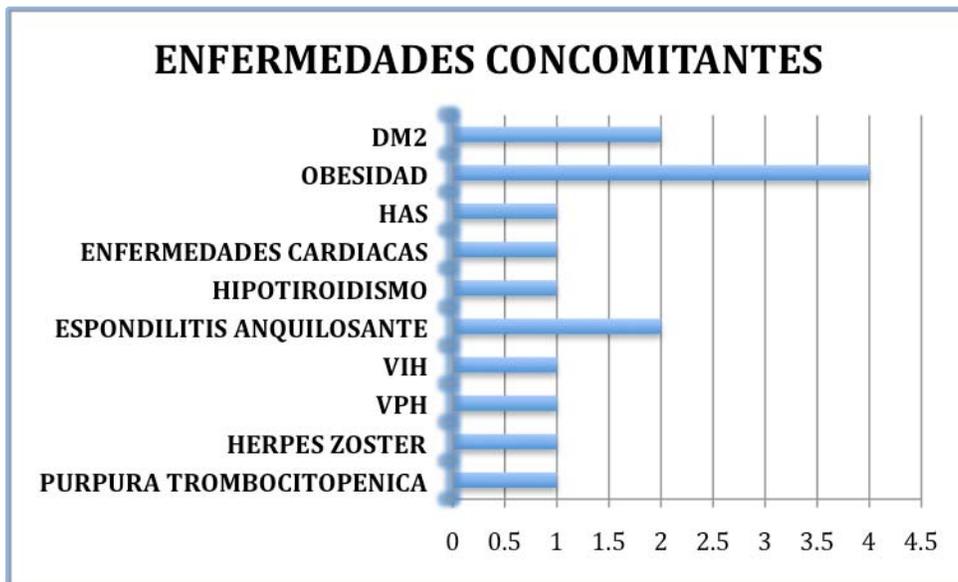
Tipo de cáncer	Población	
	Número de Pacientes	Población (%)
Cancer de mandibula	1	8.33
Cancer de mama	2	16.66
Cancer de pulmón	1	8.33
Cancer gastrico	5	41.66
Cancer neurologico	1	8.33
Leucemia	1	8.33
Cancer cervicouterino	1	8.33

**Grafica 3. Porcentaje de pacientes con cáncer en la Familia**

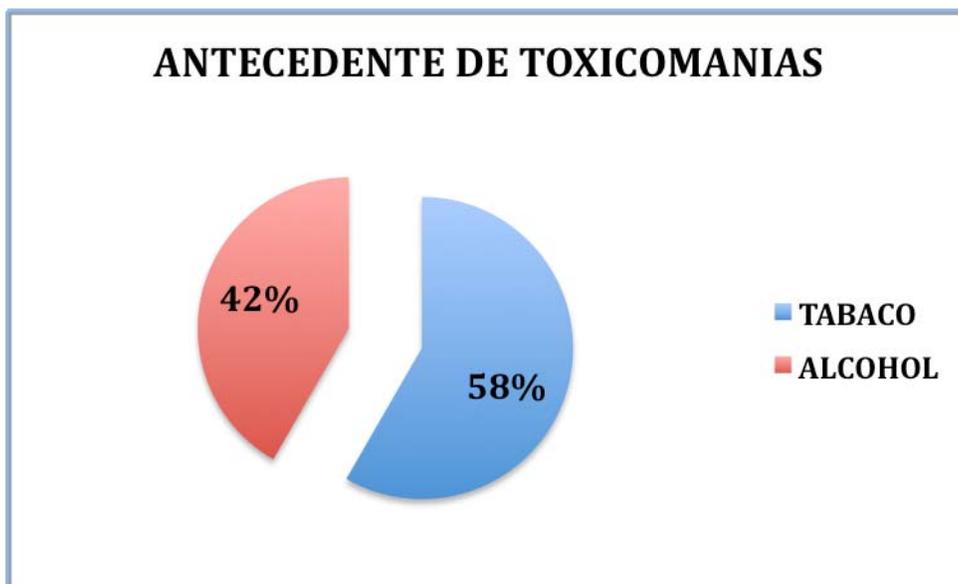


9

**Grafica 4. Enfermedades concomitantes.**



**Grafica 5. Antecedente de Toxicomanías.**



Del total de pacientes (68), solo 7 (58%) consumen tabaco y solo 5 (42%) consumen alcohol.

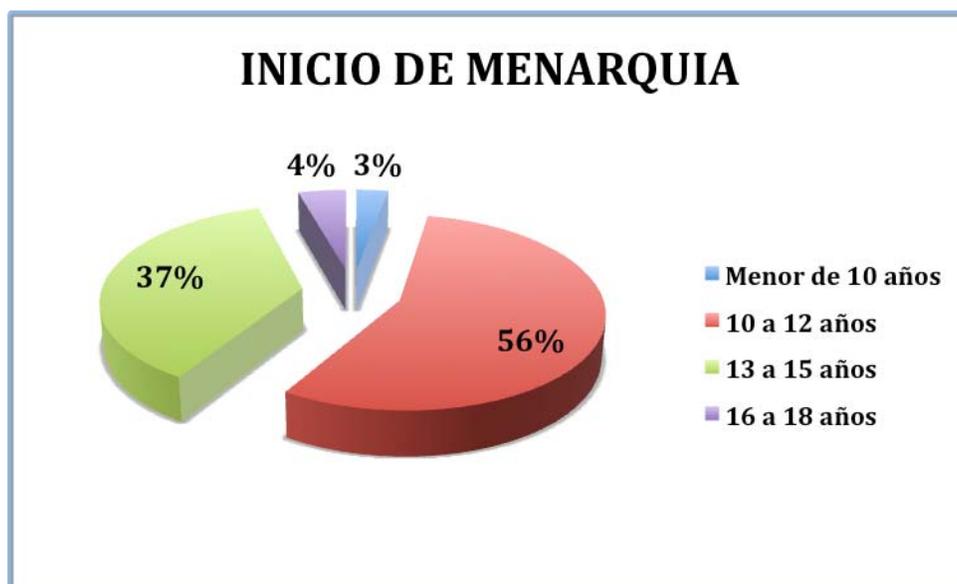
**Tabla 5. Tiempo de consumo de toxicomanías.**

Tiempo	Tabaco	Alcohol
Menos de 1 año	1	1
De 1 a 5 años	4	1
De 5 a 10 años	4	1

**Tabla 6. Edad de la Menarca.**

Intervalo de edad.	Numero de pacientes	% de Pacientes
Menor de 10 años	2	2.94
10 a 12 años	38	55.88
13 a 15 años	25	36.76
16 a 18 años	3	4.41
Total	68	

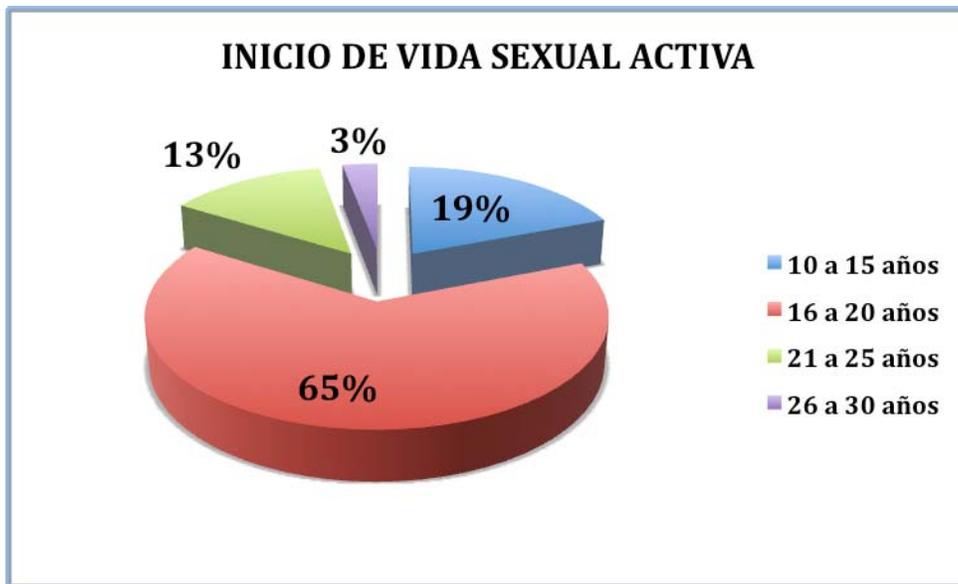
**Grafica 6. Edad de Menarquia.**



**Tabla 7. Inicio de vida sexual activa.**

<b>Intervalo de edad</b>	<b>Numero de pacientes</b>	<b>%</b>
<b>10 a 15 años</b>	<b>13</b>	<b>19.11</b>
<b>16 a 20 años</b>	<b>44</b>	<b>64.70</b>
<b>21 a 25 años</b>	<b>9</b>	<b>13.23</b>
<b>26 a 30 años</b>	<b>2</b>	<b>2.94</b>
<b>Total</b>	<b>68</b>	<b>99.98</b>

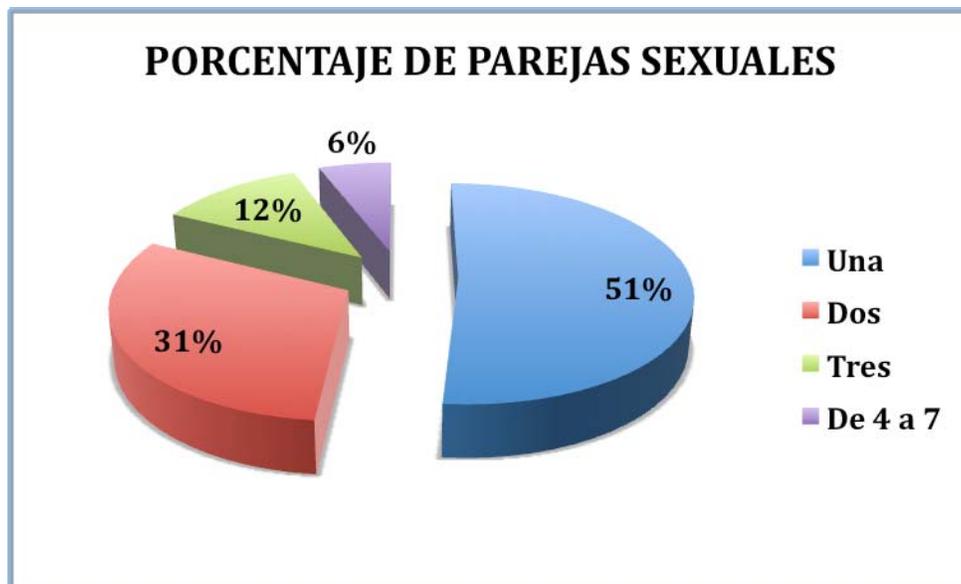
**Grafica 7. Inicio de Vida Sexual.**



**Tabla 8. Número de Parejas Sexuales.**

<b>Parejas Sexuales</b>	<b>Numero</b>	<b>%</b>
<b>Una</b>	<b>35</b>	<b>51.47</b>
<b>Dos</b>	<b>21</b>	<b>30.88</b>
<b>Tres</b>	<b>8</b>	<b>11.76</b>
<b>De 4 a 7</b>	<b>4</b>	<b>5.88</b>
<b>TOTAL</b>	<b>68</b>	

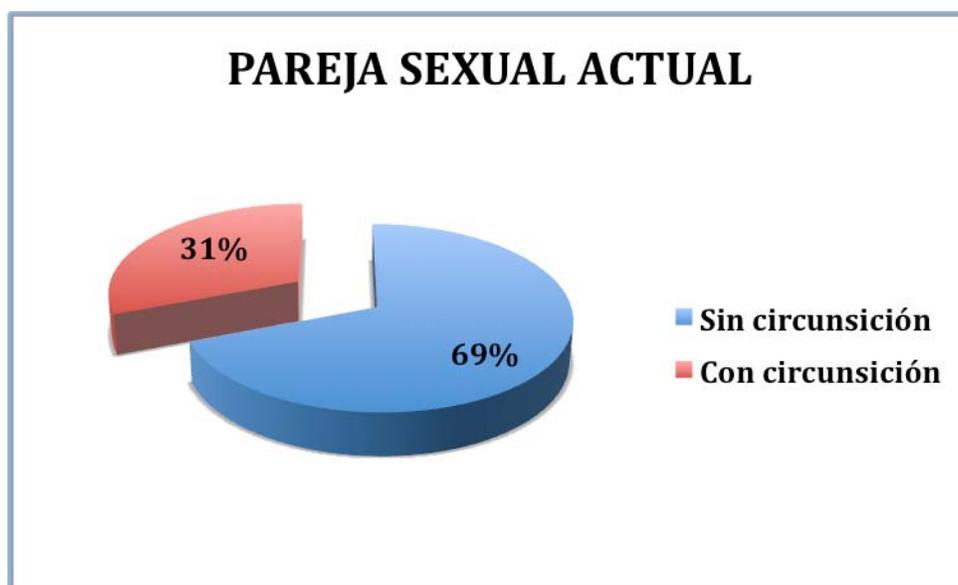
**Grafica 8. Porcentaje de Parejas Sexuales.**



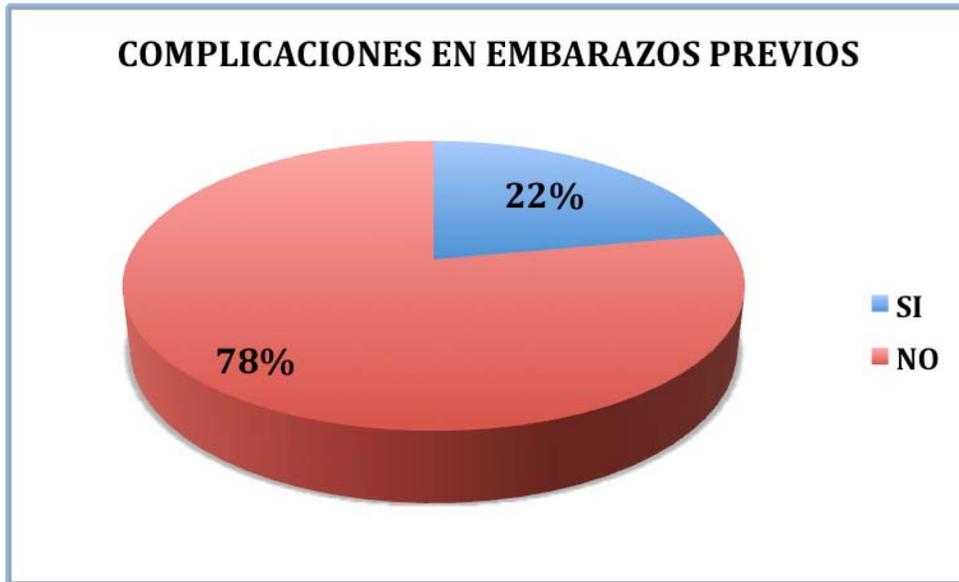
**Tabla 9. Pareja sexual actual con circuncisión.**

Sin circuncision	Con circuncision	Total
47	21	68

**Grafica 9. Pareja sexual actual con circuncisión.**

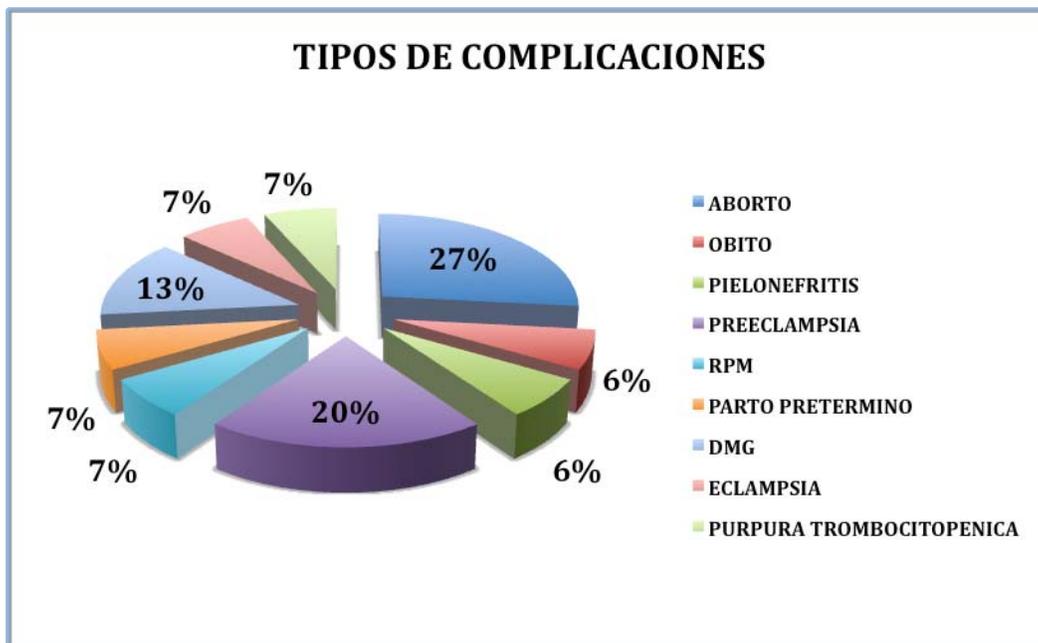


Grafica 10. Porcentaje de complicaciones en embarazos previos.

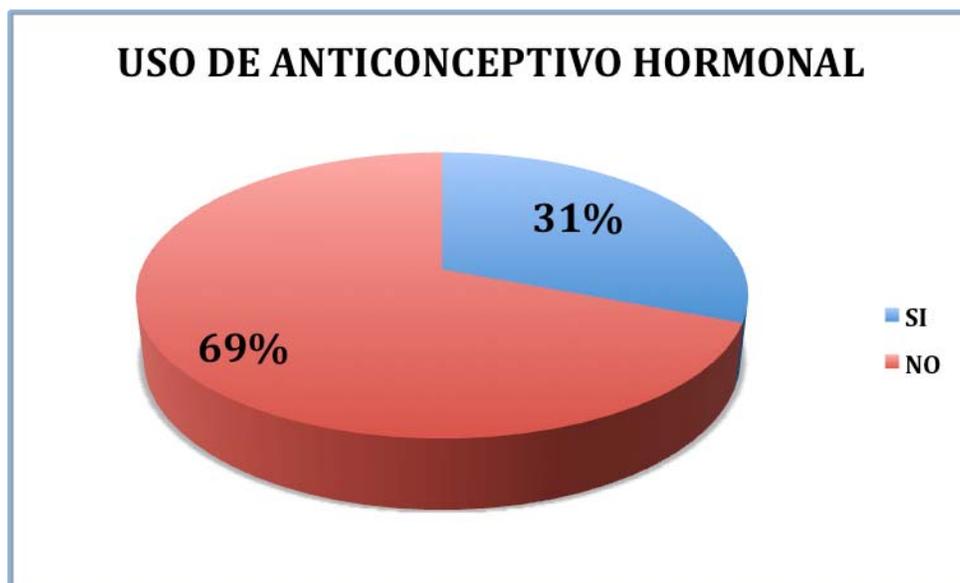


Del total de pacientes (68), solo 15 pacientes (22.05%) tuvo complicaciones en embarazos previos, el resto de las 53 pacientes (77.94%) no tuvo ninguna complicación.

Grafica 11. Tipos de complicaciones en embarazos anteriores.



**Grafica 12. Usuaris de Anticonceptivo hormonal.**

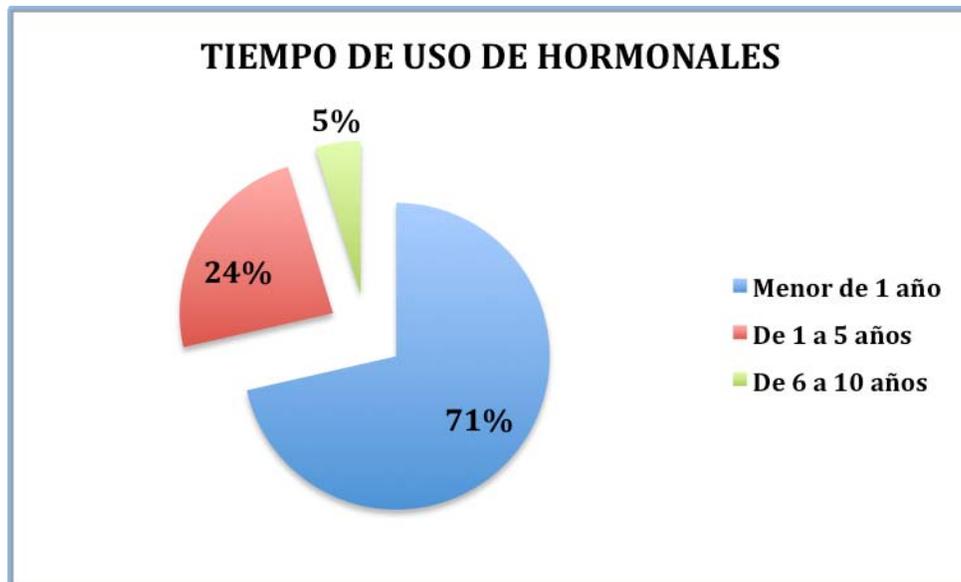


Del total de pacientes (68) solo un 30.88% (21 pacientes) fueron usuarias de anticonceptivo hormonal, mientras que un 69.11 (47 pacientes) negaron el uso de anticonceptivo hormonal.

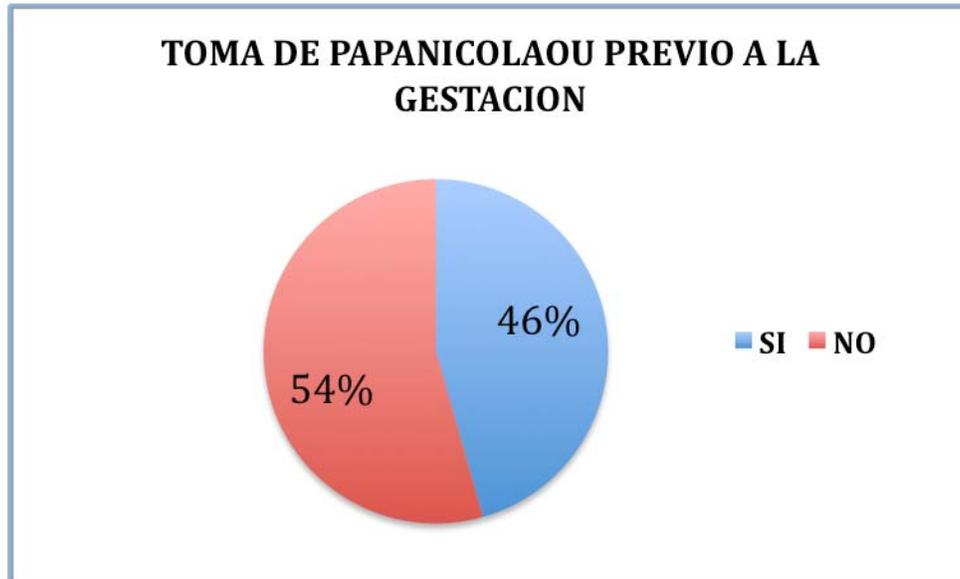
**tabla 10. Tiempo de uso de anticonceptivo hormonal.**

Menor de 1 año	15
De 1 a 5 años	5
De 6 a 10 años	1
Total	21

**Grafica 12. Usuaris de Anticonceptivo hormonal.**

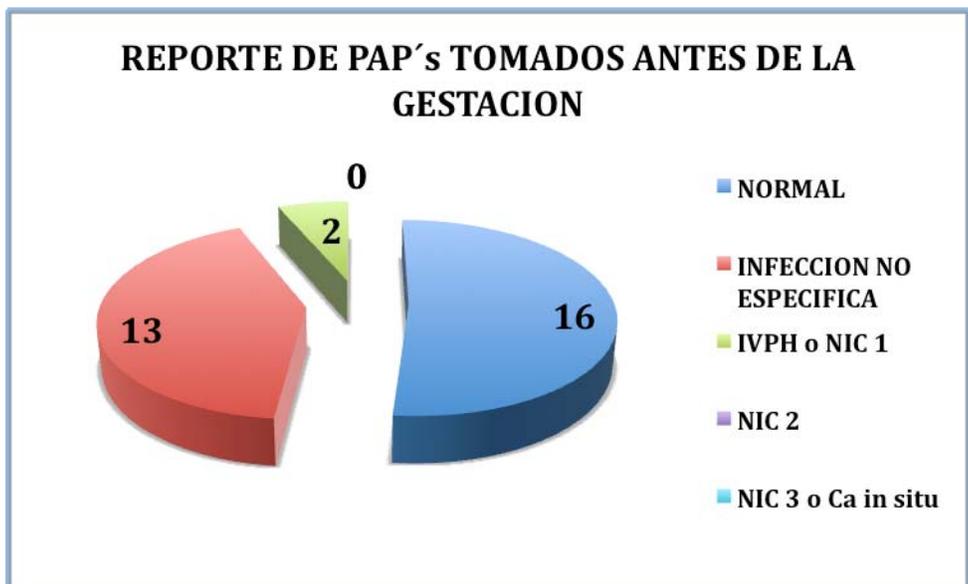


**Grafica 13. Toma de Papanicolaou antes del embarazo.**



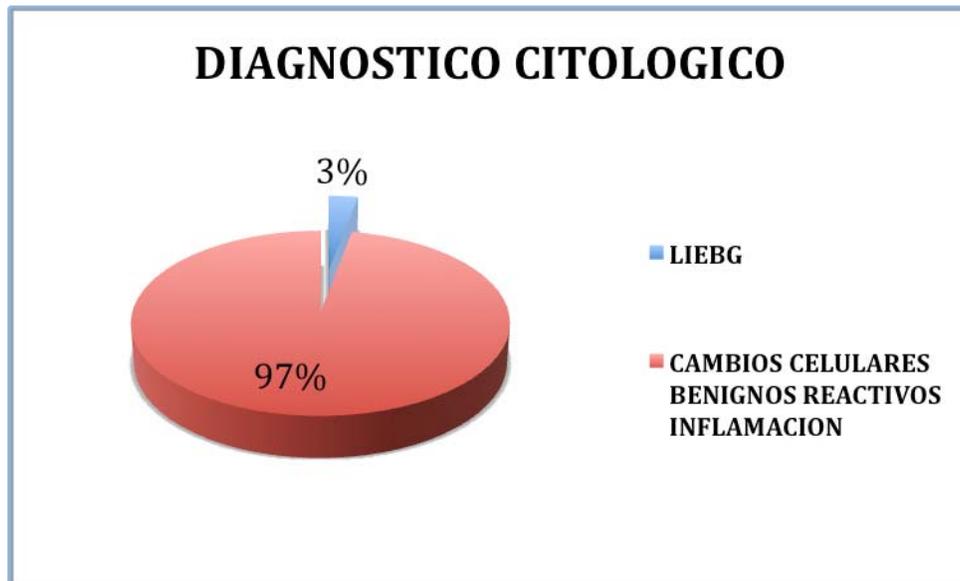
**Del total de pacientes (68), 31 refirieron toma de Papanicolaou antes del embarazo, mientras que 37 negaron la toma del Papanicolaou antes de la Gestación.**

**Grafica 14. Reporte de Papanicolaou antes del embarazo.**



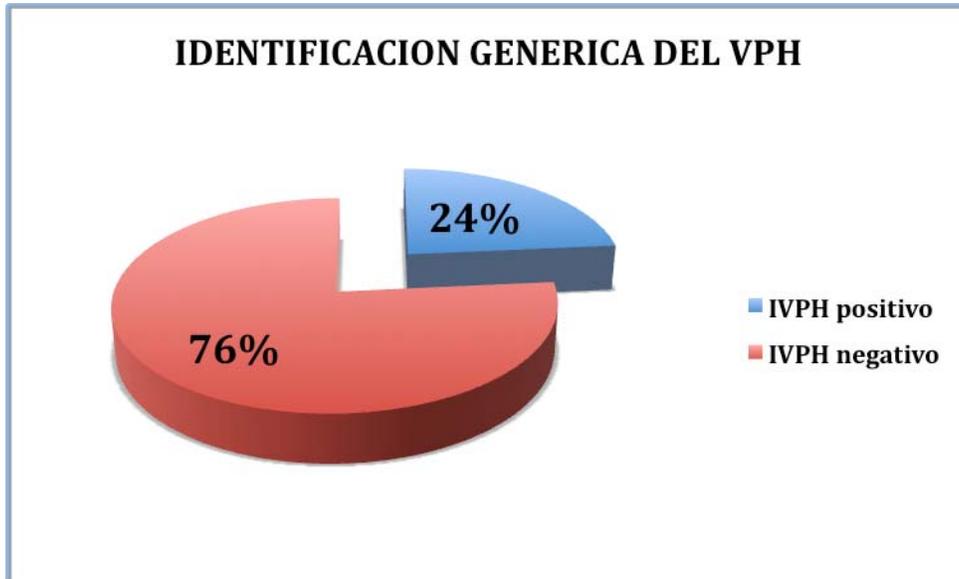
**Del total de pacientes con toma de papanicolaou antes de la gestación (31 pacientes). 16 reportaron papanicolaou normal; 13 con infección no específica y solo 2 con infección por virus del papiloma humano, ninguna con reporte de NIC 2, NIC 3 o Ca in situ.**

**Grafica 15. Reporte de Papanicolaou en muestras tomadas de pacientes.**



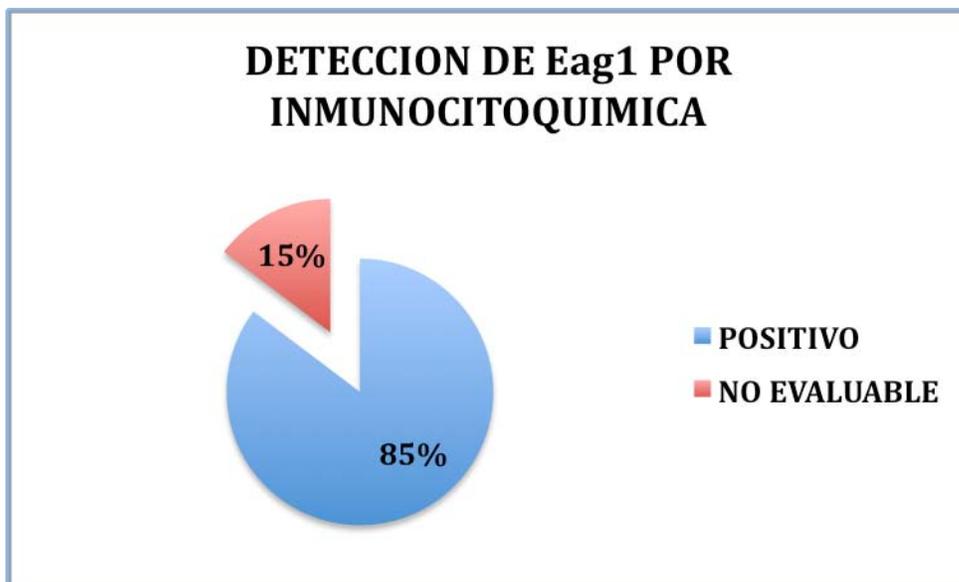
**Del total de pacientes (68), el diagnostico citologico fue de 2 pacientes con Lesion intraepitelial de bajo grado y 66 con reporte de cambios benignos inflamatorios.**

**Gráfica 16. Determinación de PCR en células cervicales.**

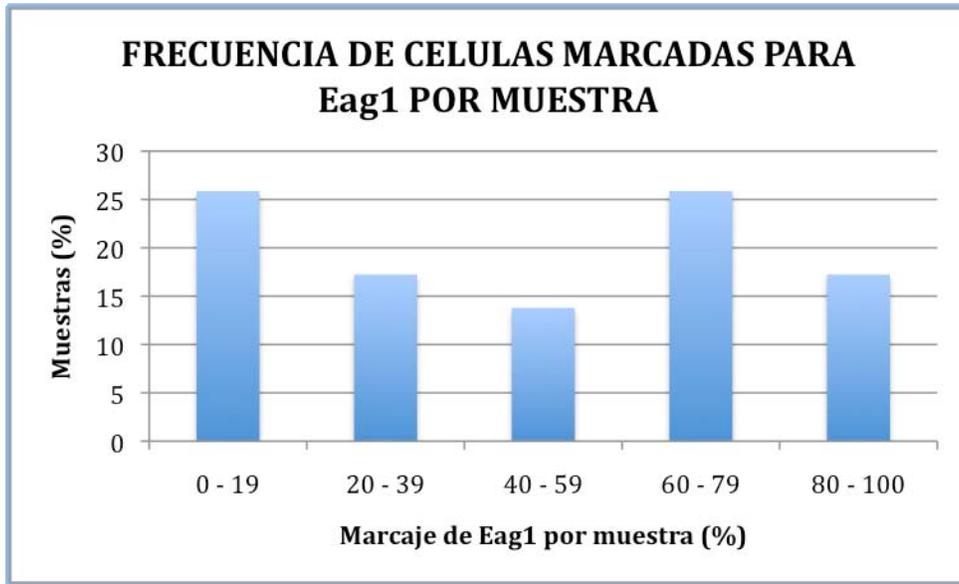


Del total de pacientes (68), 16 fueron positivas a infección por virus del papiloma humano, el resto (52) negativas a la presencia del virus, siendo diagnosticadas a nivel molecular por medio de PCR.

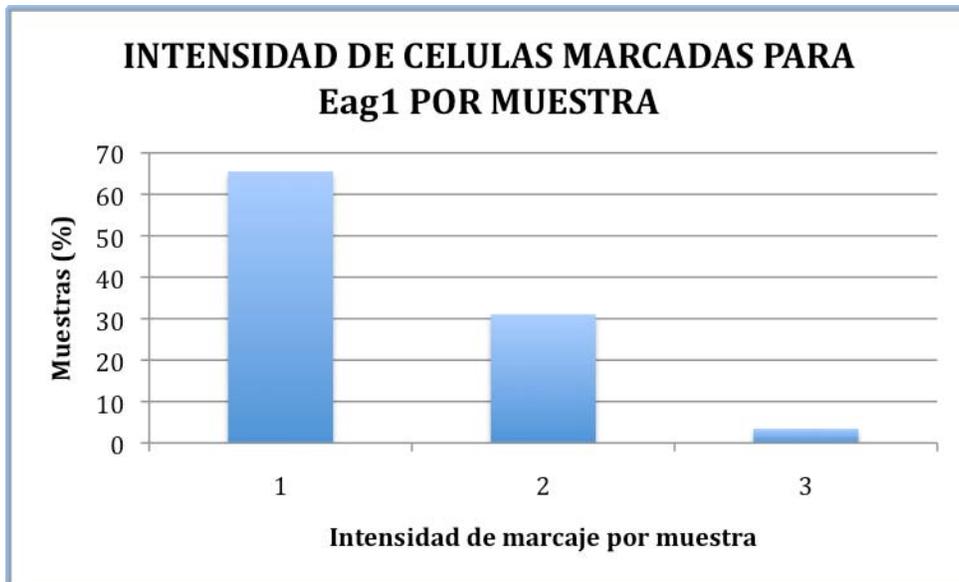
**Gráfica 17. Presencia de Eag1 en células cervicales**



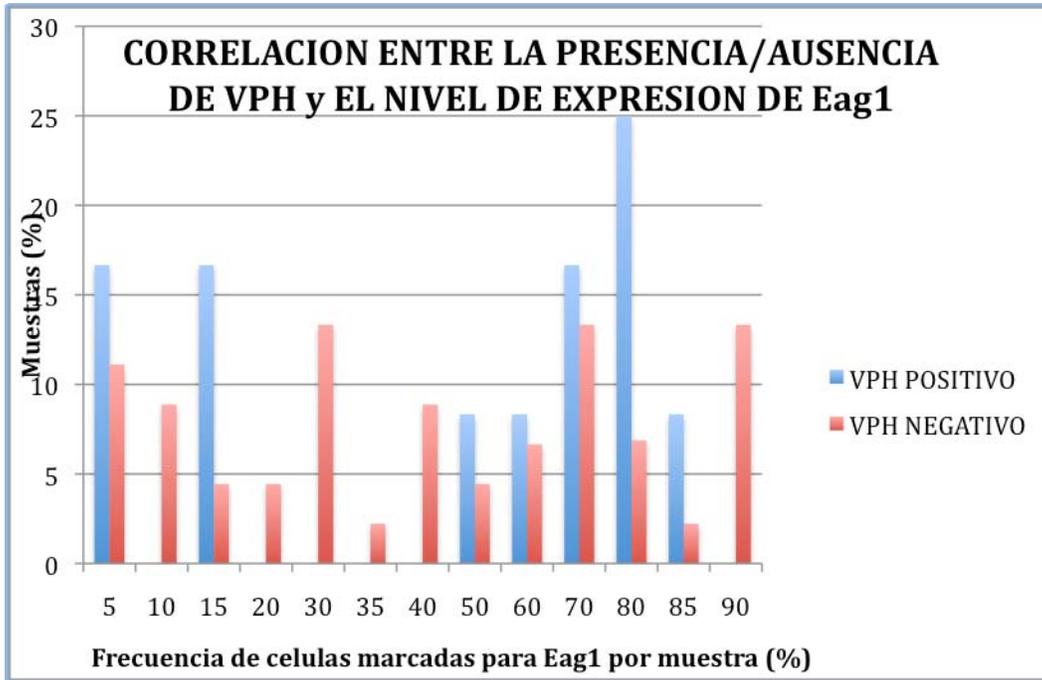
**Gráfica 18. Porcentaje de células marcadas para Eag1.**



**Gráfica 19. Intensidad de células marcadas para Eag1.**



**Grafica 20. Correlación entre la presencia y ausencia del VPH y el nivel de expresión de Eag1**



## **8. DISCUSION.**

Recientemente, ha sido postulada la expresión de la proteína E6g1 como potencial marcador tumoral (38,39) Es así, como en muestras clínicas de cáncer de pulmón, cerebro, riñón y cuello uterino se observa mayor presencia de la proteína respecto a su contraparte normal. E6g1 es ... De otro lado, se ha visto que algunos estrógenos naturales y la presencia de las oncoproteínas E6 y E7 favorecen la expresión de E6g1 in vitro (39). Por lo tanto, teniendo en cuenta que en pacientes embarazadas se encuentra un ambiente hiperestrogénico natural postulamos que pacientes embarazadas con infección por VPH existirá sobreexpresión de E6g1.

Con el fin de corroborar nuestra hipótesis, se realizaron 68 Papanicolaous en citologías de pacientes embarazadas, se determinó la presencia del VPH por PCR y se evaluó la expresión de E6g1 por inmunocitoquímica.

En cuanto a la detección genérica de VPH, el porcentaje de muestras positivas correlacionó con estudios previos en el mismo tipo de población para Mujeres embarazadas mexicanas (4). Aunque la mayor parte de muestras fueron diagnosticadas como lesiones benignas e inflamatorias, los tres únicos casos de lesión intraepitelial de bajo grado, fueron VPH positivas.

Respecto a la detección de la proteína oncogénica E6g1, esta proteína se expreso tanto en muestras VPH negativas como VPH positivas sin embargo, la frecuencia de marcaje por muestra fue mayor en la población VPH positiva (66.64%) respecto a la población VPH negativa (46.86%), motivo por lo cual, se corrobora una asociación positiva entre la presencia del virus del papiloma humano y el nivel de expresión de la proteína E6g1.

## **CONCLUSIONES.**

La frecuencia de VPH en muestras citológicas exfoliativas de cérvix de pacientes embarazadas fue del 24%.

La totalidad de las lesiones intraepiteliales de bajo grado identificadas en el estudio fueron VPH positivas

Se observó expresión de E6g1 en la totalidad de las muestras citológicas VPH positivas y VPH negativas

El nivel de expresión de la proteína E6g1 fue mayor en muestras VPH positivas, evaluado como frecuencia de células marcadas por inmunocitoquímica por muestra.

## 10. BIBLIOGRAFIA.

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. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM., (2004). *GLOBOCAN 2002; cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, iarc cancer base no. 5. Version 2.0, IARC Press, Lyon.*
9. 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.
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. Garigilio P., Gutiérrez J., Cortés E., and Vázquez J., (2009). The role of retinoid deficiency and estrogens as cofactors in cervical cancer. *Archives of medical research*; 40, 449-465.
13. Ousingsawat J, et al. (2007). Expression of voltage-gated potassium channels in human and mouse colonic carcinoma *Clin Cancer Res* 13:824-831.
14. Ortiz S, et al (2010). Eag1 potassium channels as potencial markers of cervical displasia. Revision editor Wiley DJ, Douglas J, Beutner K, et al. External genital warts: Diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Infect Dis*. 2002;35(suppl 2):S210-S224.
15. Kodner CM, Nasraty S. Management of genital warts. *Am Fam Physician*. 2004;70:2335-2342, 2345-2346.ial.

16. 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.
17. 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
18. 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
19. Bhattacharya D, Redkar A, Mitra I., (1997). Oestrogen increases S phase fraction and oestrogen and progesterone receptors in human cervical cancer in vivo. *Br J Cancer*, 75:554e558.
20. Magnusson PKE, Lichtenstein P, Gyllenstein UB, 2000: Heritability of cervical tumors. *Int. J. Cancer*, 88: 698-701
21. 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](http://www.cdc.gov/std/HPV/STDFact-HPV.htm).
22. Derkay CS, Darrow DH. Recurrent respiratory papillomatosis of the larynx. *Otolaryngol Clin North Am.* 2000;33(5):1127-1141.
23. Winer RL, Lee S-K, Hughes JP, y cols. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol.* 2003;157(3):218–226.53. Saffar MJ, Rezai MS. Long-term antibody response and immunologic memory in children immunized
24. Schiffman M, Castle PE. Human papillomavirus: Epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127:930–934.
25. 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.
26. Syrjänen KJ, Syrjänen SM. Molecular biology of papillomaviruses. In: *Papillomavirus Infections in Human Pathology*. Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons, Inc.; 2000:11–51.
27. 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.
28. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine.* 2006;24 Suppl 1:S16-22. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005;32(suppl):S7–S15.
29. Association of Reproductive Health Professionals. ARHP clinical proceedings: HPV infection and cervical intraepithelial neoplasia. Available at: <http://www.arhp.org/healthcareproviders/cme/onlinecme/hpvcpi/infection.cfm>. Accessed June 14, 2005.
30. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nature Rev Cancer.* 2002;2:342–350.
31. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005;32(suppl):S7–S15.
32. Munger K, Baldwin A, Edwards KM, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004;78(21):11451–60.

33. 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.
34. 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.
35. Pardo LA, et al. (2005). Role of voltage-gated potassium channels in cancer *J Membr Biol* 205:115-124.
36. Pardo LA, et al. (1999). Oncogenic potential of EAG K<sup>+</sup> channels *EMBO J* 18: 5540-5547.
37. Occhiodoro T, et al. (1998). Cloning of a human ether-a-go-go potassium channel expressed in myoblasts at the onset of fusion. *FEBS Lett* 434: 177-82.
38. Hemmerlein B, et al. (2006). Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours *Mol. Cancer* 5:41.
39. Farias LMB, et al. (2004). Ether à go-go potassium channels as human cervical cancer markers *Cancer Res* 64:6996-7001.
40. Ousingsawat J, et al. (2007). Expression of voltage-gated potassium channels in human and mouse colonic carcinoma *Clin Cancer Res* 13:824-831.
41. DeQueiroz FM, et al. (2006). Ether à go-go potassium channel expression in soft tissue sarcoma patients *Mol. Cancer* 5:42.
42. Pepe G.J, Albreeht ED,. (1995). Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. *Endocr Rev* 16:608.
43. Londo R, Bjelland T, Girod C, et al., (1994). Prenatal and postpartum Pap smears: do we need both? *Fam Pract Res J*, 14:359-67.
44. Economos K, Perez Veridiano N, Delke I, et al., (1993). Abnormal cervical cytology in pregnancy: a 17-year experience. *Obstet Gynecol*, 81:915-8.
45. Shingleton HM, Patrick RL, Jonhson WW, Smith RA. (1995). The current status of the Papanicolaou smear. *CA Cancer J CLin*, 45; 305-20.