



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MEDICAS, ODONTOLOGICAS Y DE LA SALUD

**“ASOCIACION DE HLA CLASE I Y II CON CANCER CERVICAL
UTERINO, SU RELACION CON VIRUS DE PAPILOMA HUMANO
(VPH) EN FAMILIARES DE PRIMER GRADO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

HERNANDEZ HERNANDEZ DULCE MARIA

TUTOR: PhD ALEJANDRO MOHAR BETANCOURT

Facultad de Medicina



MEXICO, D.F.

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.

COMITÉ TUTORAL:

DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA,

Departamento de Inmunología e Inmunogenética del Instituto Nacional de Investigación Médica y de la Nutrición "Salvador Zubirán", Secretaría de Salud.

DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCA

Dpto. de Biología Molecular, Unidad de Investigación Biomédicas de la UNAM, Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud.

DRA. MA. DEL CARMEN MARTÍNEZ GARCÍA

Académica del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

A G R A D E C I M I E N T O S

A FRANCISCO,

Incondicional compañero de esta aventura llamada... Vida

A DUCI Y PAM,

Mis pequeñas que brillan con luz propia

A MIS PADRES Y HERMANOS,

Por estimular el ser

DR. ALEJANDRO MOHAR BETANCOURT

Por permitirme compartir esta experiencia en el conocimiento, mi
cariño y aprecio...

DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ,

Por el apoyo genuino y desinteresado en el saber

DR. JULIO GRANADOS, DRA. CARMEN MARTÍNEZ

Por ayudarme a ver que no hay imposibles

DR. RICARDO M. CERDA FLORES,

Por su inconmensurable contribución a finalizar un sueño

A MIS COMPAÑERAS Y AMIGAS:

**LIC. TERESA APRESA GARCÍA,
DRA. LAURA ORNELAS BERNAL,
LIC. SANDRA SÁNCHEZ GARDUÑO,
HERMILA MIRAMONTES R, †**

De quiénes aprendí el valor de la responsabilidad, respeto y profesionalismo para llevar a cabo con éxito una meta en la vida

A NUESTRAS PACIENTES:

Mujeres mexicanas, ejemplo de valor y coraje, que aceptaron acompañarnos en esta travesía, confiando en que su aportación ayude a salvar otras vidas.

A quiénes no pudieron ser citados pero que tuvieron una contribución invaluable.

A TODOS USTEDES
MI PROFUNDO AGRADECIMIENTO

I N D I C E

1. RESUMEN

1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del Problema.....	2
1.3 Hipótesis.....	2
1.4 Objetivo General.....	3
1.5 Material y Métodos.....	3
1.6 Resultados.....	4
1.7 Conclusiones.....	7

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer cervicouterino (CCU).....	8
2.2 Historia Natural del cáncer de cérvix.....	9
2.3 Factores de riesgo.....	10
2.4 Virus de Papiloma Humano (VPH).....	12
2.5 Biología molecular del VPH.....	14
2.6 Otros mecanismos de transmisión.....	16
2.7 Antígenos de leucocitos humanos (HLA).....	16
2.8 Infección por VPH y expresión de HLA.....	18
2.9 HLA clase II y Linfocitos T cooperadores (THLs).....	19
2.10 Alelos de HLA y cáncer de cérvix.....	21
2.11 Cáncer de cérvix y riesgo genético.....	24

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....25

4. JUSTIFICACION.....29

5. HIPOTESIS.....	30
6. OBJETIVOS.....	31
7. MATERIAL Y METODOS	
7.1 LUGARES DE ESTUDIO.....	33
7.2 DISEÑOS DE ESTUDIO.....	35
7.3 POBLACION DE ESTUDIO.....	36
7.4 MARCO MUESTRAL.....	38
7.4.1 TAMAÑO DE MUESTRA	39
7.5 VARIABLES.....	41
7.5.1 DEFINICIONES	42
8. DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO	
8.1 PRUEBA PILOTO.....	44
8.2 RECOLECCION DE DATOS.....	44
8.3 METODO RECOLECCION MUESTRA VPH.....	45
8.4 DETERMINACION DE VPH.....	46
8.5 DETERMINACION DE HLA.....	48
9. PLAN DE ANALISIS.....	51
10. CONSIDERACIONES ETICAS.....	54
11. RESULTADOS.....	56
11.1 PROBLEMA 1.....	57
11.2 PROBLEMA 2.....	61
12. DISCUSION	
12.1 PROBLEMA 1.....	67
12.2 PROBLEMA 2.....	73

13. CONCLUSIONES.....	79
14. APOYOS RECIBIDOS.....	81
15. PRODUCTOS GENERADOS.....	81
16. REFERENCIAS.....	83
17. TABLAS	
17.1 PROBLEMA 1.....	102
17.2 PROBLEMA 2.....	109
18. GRAFICOS.....	119
19. ANEXOS.....	123

1.RESUMEN.

1.1 Introducción.

La infección por Virus de Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo y particularmente el VPH 16 es una condición necesaria para el desarrollo de una lesión cervical, pero solo una fracción de las lesiones precursoras progresan a cáncer invasor. Esto implica que se requiere la presencia de factores adicionales, además del tipo viral, para aumentar las probabilidades de presentar cáncer invasor. Tales factores pueden incluir la capacidad inmunológica inherente del hospedero para responder a la infección por VPH.

Se ha observado que diferencias en la respuesta inmune a VPH afecta el curso de la infección hacia la eliminación o persistencia viral. Los alelos de Antígenos de Leucocitos Humanos (HLA-human leucocytes antigens) están relacionados a la presentación de antígenos extraños a las células inmunológicas, para desencadenar una respuesta contra virus y otros patógenos. Debido a que se piensa que la respuesta inmune a VPH es un importante determinante para la adquisición y persistencia de la infección que conlleva a la presencia de lesiones de alto grado y cáncer, es plausible pensar que las variaciones de HLA pueden afectar la patogénesis cervical a través del control inmunológico de VPH.

Informes sobre la susceptibilidad específica a ciertas variantes de mayor agresividad pertenecientes a infección por VPH-16 en población mexicana y ante las evidencias de que México ocupa uno de los primeros lugares en el mundo en el desarrollo de CC invasor, conducen a pensar en factores genéticos de susceptibilidad y ambientales que estén involucrados en la cadena de causalidad del cáncer de cérvix.

1.2 Planteamiento del Problema.

¿Se presenta una asociación entre los alelotipos y/o haplotipos de HLA clase I (A,B), clase II (DR,DQ) con Cáncer Cervicouterino en mujeres mestizo-mexicanas infectadas por VPH16?

¿La presencia de alelotipos y/o haplotipos de HLA clase I y II identificados como de riesgo y/o protección en pacientes con CC, está asociado con infección por VPH de alto riesgo en las familiares de primer grado?

1.3 Hipótesis.

Existe una asociación de susceptibilidad ($OR \geq 2.0$) o de protección ($OR \leq 0.5$) en uno o mas de los alelotipos y/o haplotipos de HLA clase I y II (HLA-A: A2, A9, A28, HLA-B: B7, B14, HLA-DR: DR5, DRB1*1501, HLA-DQ: DQB1*0602), con Cáncer Cervical invasor en mujeres mestizo-mexicanas infectadas por VPH 16.

Cuando el familiar femenino de primer grado presenta uno o mas de los alelotipos y/o haplotipos de susceptibilidad de HLA clase I y/o II, la probabilidad de presentar VPH es mayor ($OR \geq 2.0$).

1.4 Objetivo General:

Evaluar la fuerza de asociación de las frecuencias alelicas y/o haplotípicas de los loci HLA clase I,II utilizando técnicas de DNA con la presencia de CC en población mestizo-mexicana positiva a VPH 16. Determinar la asociación de los alelotipos y/o haplotipos de susceptibilidad de HLA clase I, II identificados en los familiares de primer grado con la infección por Virus de papiloma humano de alto riesgo.

1.5 Material y Métodos

Diseño: Problema 1: Diseño de Casos y Controles. Problema 2: Transversal Analítico.

Población de Estudio: Mujeres con y sin diagnóstico de CC Invasor y un familiar femenino de primer grado con inicio de vida sexual.

Lugares de Estudio. Hospitales de Oncología y Unidades de Primer Nivel de Atención Médica de la Ciudad de México. Secretaría de Salud (SSA) e Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Tamaño muestra: 104 casos y 104 controles. Mismo número de familiares femeninas de primer grado, estimado. El análisis en familiares se limitó a 24 familiares de casos y 24 familiares de controles.

Variables: Dependiente. Primer Problema: Cáncer Cervical Invasor positivas a VPH16. Segundo Problema: Infección por VPH. Independiente: HLA (Human Leucocyte Antigen), en ambos problemas. Otras variables clínicas, sociales y reproductivas.

Mediciones. VPH se determinó por Captura de Híbridos II, en células de descamación endocervical y su proceso se realizó en el Departamento de Biología Molecular, de Biomédicas de la UNAM. Los loci de clase I (HLA-A y B) y clase II (HLA-DRB1 y DQB1) fueron tipificados en Linfocitos de sangre periférica por PCR-Sequence Specific Oligonucleotides, Reverse Dot Blot (Amplicor Kit), con pruebas estandarizadas realizadas en el servicio de Fisiología celular del Instituto Nacional de Cardiología.

Análisis. La prueba de Hardy-Weinberg, las frecuencias alélicas y haplotípicas, así como la prueba de homogeneidad para haplotipos fueron estimadas por máxima verosimilitud con el programas Arlequín v. 3.01. La comparación entre las frecuencias génicas de alelos específicos para HLA I,II, se realizó a través de chi cuadrada y calculando la razón de momios (OR) e Intervalos de confianza al 95%, considerando como unidad de análisis el individuo, realizando corrección de los valores de p por el número de comparaciones.

Resultados.

Un total de 1200 mujeres aceptaron participar en el estudio (300 por cada grupo, pacientes con CCU, mujeres sin neoplasia y los respectivos familiares), de las cuales en 1050 se realizó la determinación de VPH. De 285 pacientes con CCU, 6 fueron negativas a VPH (2.1%), 140 positivas a VPH 16 (49.1%), 139 positivas a otros tipos de VPH (48.8%). La prevalencia de infección por VPH de alto riesgo en mujeres control, en las familiares de casos y en familiares de controles fue de 9% (25/277), 18.1% (40/221) y de 16.5% (44/267) respectivamente.

Del total de pacientes con CCU positivas a VPH16 (n=140), se eligieron aleatoriamente 104 pacientes y un número similar de controles (negativas a VPH). En las familiares se eligió una muestra de 54 mujeres, 27 de cada grupo, con y sin cáncer.

Resultados 1. No se observaron diferencias estadísticas en las características sociodemográficas entre las pacientes con cáncer y mujeres control de la población analizada para HLA, sin embargo se diferenciaron en las variables de tipo reproductivo como la edad de inicio de vida sexual menor a 18 años, tener mas de una pareja sexual y haber tenido el antecedente de tres o mas partos ($p < 0.05$).

Asociaciones consistentes con otros estudios en mujeres con CCU e infectadas con HPV16 se observaron para HLA-DRB1*15 (OR = 3.9; 1.6-10.2) y el haplotipo DRB1*15/DQB1*0602 (OR = 4.1; 1.4-12.7). Los haplotipos HLA-A2-B44-DR4-

DQ*0302, HLA-A24-B35-DR16-DQ*0301, y HLA-A2-B40-DR4-DQ*0302 mostraron una asociación positiva con CCU ($OR > 1$), mientras que HLA-A2-B39-DR4-DQ*0302, HLA-A24-B35-DR4-DQ*0302, y HLA-A68-B40-DR4-DQ*0302 mostraron una asociación negativa ($OR < 1$). La carga viral fue diferencialmente mayor en pacientes con CC que presentaron los haplotipos HLA A1-DR13 y HLA A24-B15.

Resultados 2. En las mujeres familiares de casos y controles ($n_1=214$, $n_0=264$), se obtuvo una prevalencia de infección por VPH alto riesgo de 18.7%, IC95% 13.2-24.1 y de 17.0%, IC95% 12.3-21.8, respectivamente, sin mostrar diferencias de prevalencias entre los grupos ($RP=1.1$; IC95% 0.7-1.6). Las variables que mostraron asociación con la infección por VPH alto riesgo fueron población con bajo nivel social ($OR_a= 3.0$; 1.3-6.9), mujeres no casadas ($OR_a= 1.8$; 1.1-2.9), inicio de vida sexual menor a 18 años ($OR_a= 2.6$; 1.1-6.3), tener mas de una pareja sexual ($OR_a= 3.4$; 1.1-7.3) y el uso de hormonales inyectables ($OR_a= 3.3$; 1.3-8.4).

En la muestra analizada de familiares para HLA ($n=54$), la frecuencia de VPH fue de 16.7%, IC95% 7.9-29.3; no diferente estadísticamente de la muestra original ($p=0.9$). De los haplotipos de riesgo observados en la población de casos y controles solo uno fue identificado en una familiar positiva a VPH AR (HLA-A2-B18), mientras que de los haplotipos con $OR < 1$, se identificaron 5 haplotipos de HLA A2-B39, 2 haplotipos de HLA-A24-B35-DR4-DQ*0302, 8 haplotipos de HLA-B35-DR8. Dos de éstos haplotipos con asociación negativa, fueron observados en

familiares con infección a VPH AR (HLA-B35-DR8). Al medir la asociación entre los haplotipos de HLA clase I y II con la infección positiva a VPH AR entre la población de familiares, solo un haplotipo fue identificado con una asociación positiva HLA-A24-B40-DR4-DQ*0302 (OR=22; 1.6-659). De manera consistente éste haplotipo fue identificado solo en mujeres con cáncer cervical positivas a VPH16, pero con una baja frecuencia no significativa (n=3).

1.7 Conclusiones. Los datos muestran que en presencia de infección por Virus de Papiloma Humano tipo 16 en pacientes con cáncer cervical uterino los haplotipos de HLA clase I y II, DRB1*15/ DQB1*0602, HLA-A2-B44-DR4-DQ*0302, HLA-A24-B35-DR16-DQ*0301, y HLA-A2-B40-DR4-DQ*0302 están asociados positivamente con ésta neoplasia.

2. ANTECEDENTES.

2.1 CÁNCER CERVICOUTERINO (CCU).

El cáncer de cérvix es el segundo cáncer mas frecuente de distribución mundial que se presenta en la población femenina, con una estimación de 555 100 casos nuevos, de los cuales aproximadamente el 80% se presentan en los países en desarrollo. Las tasas mas altas de incidencia por CCU se presentan en Latinoamérica, el Caribe, el sur de África y Asia, con intervalo desde 29.4 a ≥ 42.8 x 100 000 mujeres, que comparativamente con otras áreas geográficas de baja frecuencia llegan a ser de 3 a 6 veces mayor (≤ 7.2 x 100 000 mujeres) (1,2). Las muertes por CCU ocupan el tercer lugar de la mortalidad por cáncer en la mujer con un total de 309 800 defunciones, representando el 15.5% de las muertes ocurridas en poblaciones de centro y Sudamérica. En los países en desarrollo su mayor importancia es debido a las altas tasas de mortalidad reportadas, las cuales están relacionadas con el diagnóstico tardío en etapas avanzadas de la enfermedad (3,4).

En México de acuerdo a la OMS la frecuencia de casos nuevos fue de 12 516 casos con 5777 muertes atribuibles a ésta neoplasia y una prevalencia a cinco años de 35 886 casos, información correspondiente al año 2002 (5). Para el 2007, la mortalidad por neoplasias malignas a nivel nacional en el sexo femenino ocupó el tercer lugar como causa de muerte, falleciendo un total de 35 303 mujeres. De éste total el 15% de las defunciones por tumores malignos corresponden al cáncer

de mama y el 13.9% al de cérvix uterino, ocupando los dos primeros lugares de mortalidad por cáncer (6).

2.2 HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER DE CÉRVIX.

De acuerdo a la historia natural de CC se ha mostrado que está precedido por una serie de lesiones celulares dentro del epitelio endocervical. Estas lesiones consideradas como preinvasoras son denominadas como Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC). Desde el punto de vista histológico se clasifican en tres grupos, NIC 1, NIC 2 y NIC3, de acuerdo al grado de lesión celular dentro del epitelio (7,8). La Terminología del Sistema Bethesda fue diseñada para estandarizar el sistema de reporte para la prueba de Pap, y se basa en la descripción morfológica de las lesiones, permitiendo identificar datos que sugieren infección por VPH y las alteraciones celulares relacionadas con el desarrollo de CC, las cuáles fueron identificadas como ASCUS (Atipia de células escamosas de significado indeterminado) y Lesiones Escamosas Intraepiteliales (LEI) de bajo y alto grado (9,10). Actualmente no hay un acuerdo internacional sobre el uso de la nomenclatura, sin embargo, y por fortuna son equivalentes y en cada lugar ha sido adoptado alguno de estos sistemas, considerando sus ventajas y limitaciones, asimismo se ha propuesto el uso del Sistema Bethesda para la lectura de las citologías cervicovaginales, mientras que la nomenclatura de NIC para las biopsias (11).

En estudios prospectivos se ha reportado que las LEI de bajo grado (LEI-BG) pueden llegar a presentar tasas de regresión espontánea sin tratamiento en más del 60% de los casos en una mediana de seguimiento de 12 a 18 meses, y llegar a alcanzar tasas de 91% a los tres años de seguimiento. Mientras que el riesgo de desarrollar LEI-AG o NIC3 en las mujeres incluidas en estas cohortes fue de 3 a 5% (12,13). Por otro lado en un reporte de meta-análisis de la historia natural del CC, realizado con un total de casi 28 mil pacientes, la tasa de progresión reportada en quienes fueron detectadas con LEI-AG a un cáncer invasor posterior a un seguimiento de dos años, fue de 1.44% (0%-3.95%) (14). Algunos autores afirman que transcurre alrededor de diez años en promedio a partir de detectarse alteraciones de bajo grado para llegar a presentarse un cáncer invasor in situ (15).

De acuerdo a la edad, el pico de incidencia para NIC3 se ha reportado de 27 y hasta 35 años de edad promedio, mientras que para el cáncer invasor se presenta al menos diez años más tarde reportando una media de 48 años, lo que hace evidente la progresión de la enfermedad con la edad (16,17).

2.3 FACTORES DE RIESGO

La gran cantidad de estudios epidemiológicos, moleculares y experimentales realizados en la búsqueda de asociaciones causales, han demostrado que el virus de papiloma humano (VPH) es el principal agente etiológico del CCU (18-20). Los primeros estudios mostraron una relación muy fuerte entre factores sexuales y reproductivos con la presencia de CC invasor y lesiones precursoras. Consistente

con la etiología infecciosa un importante efecto ha sido observado en mujeres que refirieron tener múltiples parejas sexuales, mostrando un exceso de riesgo dos y hasta diez veces mayor, cuando se identificaban un mayor número de parejas (>10 parejas). El inicio de vida sexual antes de los 18 años fue asociada con un exceso de riesgo que varía entre 1.5 a 5 veces mayor, sin mostrar una relación lineal, de manera correlacionada el primer embarazo en menores de esta edad, presentan un impacto similar en el riesgo. Los embarazos múltiples (>3) asimismo, elevan significativamente el riesgo, aún después de ajustar por otros parámetros sexuales (21-24).

Las coinfecciones del VPH con otros agentes infecciosos de transmisión sexual tales como *Chlamydia trachomatis*, el virus herpes simple tipo 2 (HVS-2) y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), posiblemente condicionen un efecto sinérgico que aumentan las posibilidades de alteraciones celulares que conducen al desarrollo de una neoplasia. La infección por *Chlamydia trachomatis* y marginalmente el HVS-2, favorecen la entrada y persistencia de múltiples tipos de VPH, lo cual conduce a integración viral, inhibición de apoptosis, sobreexpresión de oncogenes E6/E7 y transformación celular (25, 26). En mujeres infectadas con HIV la frecuencia de infección por VPH es alrededor de 50% y llegando hasta 75% en edades de 25-34 años, casi cuatro veces mayor a la reportada en población sin riesgo. En este grupo de mujeres se observa una mayor frecuencia de infección relacionada con menor conteo de células CD4 y mayor severidad de lesiones cervicales (27).

Entre las mujeres usuarias de anticonceptivos orales, el riesgo de CCU aumenta con el incremento en la duración del uso (RR para 5 años o más comparado con no usuarias, 1.9; IC95% 1.7-2.1). El riesgo disminuye al mismo nivel de las no usuarias después de 10 años de suspender el uso (28). En un estudio reciente se observó que las mujeres usuarias de hormonas sexuales esteroideas tienen un efecto interactivo dependiente de un polimorfismo de la haptoglobina, una proteína que actúa en la modulación de la respuesta inmune local en epitelios. Se observó que en las portadoras del alelo 1 de la haptoglobina y usuarias de hormonales esteroideos el RR aumento seis veces en relación a las no portadoras y no usuarias (29).

Otros agentes no infecciosos, sino químicos como es el tabaquismo es uno de los factores que se ha estudiado de manera importante en la asociación con el CCU. Altas concentraciones de los constituyentes del tabaco en el moco cervical y las concentraciones séricas, han mostrado una evidencia biológica en el desarrollo del CCU. Se ha observado que la fracción del DNA en fase-S (como una medida de proliferación) estuvo correlacionado con la cantidad de cigarrillos fumados y el nivel sérico de progesterona (30). En otro estudio realizado en mujeres mexicanas se observó una asociación entre un polimorfismo del CYP1A1 (MspI) con CCU, potencializando el efecto tres veces mas en mujeres fumadoras cuando se encontraba presente el genotipo C/C, comparando con mujeres no fumadoras y sin este genotipo. Las enzimas derivadas del CYP1A1 juegan un papel

significativo en la destoxificación de los hidrocarburos aromáticos y aminas aromáticas presentes en el cigarro (31,32).

2.4 VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH).

La infección genital por VPH es considerada como una de las infecciones más frecuentes de transmisión sexual (ETS) en la población mundial, presente sobretodo en mujeres jóvenes; aunque también están ampliamente difundidas en adultos que han sido sexualmente activos (33). La infección del epitelio escamoso del tracto genital por diferentes tipos de VPH se manifiesta en forma clínica, subclínica o latente. La infección clínica por VPH se define como cualquier lesión visible en el epitelio y/o que causa síntomas. La infección subclínica no causa síntomas y puede diagnosticarse solo con ayuda del colposcopio o microscopio, mientras que la infección latente no se asocia con anormalidades del epitelio escamoso y puede ser detectada solo por virología. La historia natural de la infección por VPH demuestra que la resolución espontánea se presenta en el 90% de mujeres inmunocompetentes en aproximadamente el curso de dos años (17). La tasa de infección en población femenina, se estima en 40% para mujeres de 20 a 29 años de edad, y en población general independiente de la edad se reportan cifras de 13 a 15% (17,34,35), cifras que exceden por mucho el número de casos de cáncer invasor estimado en menos del 0.01%. Por otro lado más del 98% de los casos de cáncer invasor del cérvix uterino están asociados a algún tipo de VPH. Esta es la principal razón por lo que se ha establecido que la infección por VPH es una causa necesaria pero no suficiente para desarrollar un cáncer invasor

(36). Así se han determinado otros factores de riesgo que se asocian tanto a la adquisición de una infección por VPH como a su persistencia, condiciones que favorecen el subsecuente desarrollo de un cáncer invasor. Entre ellos se encuentra los tipos y subtipos virales, identificando como los de mayor probabilidad para la persistencia de la infección a los VPH-31-16-58 y 52 (37). La carga viral, definida como el número de genomas de VPH presentes en las células, ha mostrado una correlación con la severidad de la enfermedad, niveles mayores de VPH de alto riesgo fueron detectados en NIC3 y lesiones invasoras comparados con los presentes en lesiones de bajo grado así como también se ha relacionado con la persistencia de la infección por VPH (38,39).

2.5 BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VPH.

El virus de papiloma humano está compuesto por 8,000 nucleótidos de DNA (40). El genoma viral se ha dividido en tres regiones principales: una región tardía L (Late) (L1 y L2) que codifica para las dos proteínas que forman la cápside viral. La región temprana E (Early) formada por 6 marcos de lectura, que contiene los oncogenes virales E1 y E2 que están involucrados en la regulación de la transcripción y la replicación viral, así como las oncoproteínas multifuncionales E6 y E7 que participan directamente en los procesos de inmortalización y transformación maligna. Y una tercera región de menos de 1000 pares de bases, que controla la transcripción temprana y el origen de replicación. La característica

intracelular invasiva del VPH en la integración del DNA celular, modifica y mantiene para su beneficio la regulación que permite inmortalidad celular (40,41).

Los VPH son clasificados en genotipos sobre la base de la secuencia de los ácidos nucleicos que componen su genoma; los genotipos individuales de VPH se definen por tener marcos de lectura abiertos en L1, E6 y E7 que difieran en más del 10%. Se han detectado más de 120 genotipos de Virus de Papiloma Humano y 20 de éstos se han detectado en el tracto genital humano (19). Los tipos de VPH que se encuentran con mayor frecuencia en lesiones precursoras y malignas de CC son los VPHs 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66 y 68 por lo que se han considerado como que su presencia es de alto riesgo para el desarrollo de cáncer invasor. Mientras que en los casos de verrugas genitales u otro tipo de lesiones menores es frecuente encontrar los tipos 6,8,11 y los relacionados con los tipos por género VPH alfa 3 y alfa 15 (VPHs 61,62,71,72,81,83,84 y 89) considerados de bajo riesgo para cáncer (42-44). A nivel mundial el VPH16 es el genotipo más frecuente encontrado en el cáncer cervical (50%; 45%-64%), seguido del VPH18 (14%; 6%-23.4%), VPH45 (8%; 3%-13.8%) y VPH31 (4.5%; 1%-7-2%), con variaciones según las diferentes áreas geográficas (34,42,45).

El análisis de secuencias de DNA, de aislados virales de papilomavirus obtenidos de diferentes regiones y grupos étnicos, ha permitido detectar variantes de los VPH 16 y 18 (46-48). El estudio de éstas variantes ha permitido establecer árboles filogenéticos que muestran su evolución molecular y establecer que es tan antiguo como el hombre mismo (49). De ahí que la distribución y diseminación del VPH

esté en relación con los movimientos poblacionales (50). De acuerdo con los resultados de estos autores (46-48), se han identificado cinco diferentes ramas filogenéticas para el VPH16, la europea, la asiática, asiática-americana, africana-1 y africana-2 (43,47).

Las variantes del VPH16 y VPH18 han mostrado una distribución diferencial entre la severidad de las lesiones cervicales en CCU, muy probablemente debido a sus diferencias filogenéticas (51,52). En México las variantes de VPH16 reportadas con mayor frecuencia son VPH16 var E (58.8%), VPH 16 var AA-a (32.3%) y VPH 16 var AA-c (8.8%). De manera interesante VPH16 var AA-c a pesar de su baja frecuencia solo fue observada en casos de cáncer invasor (53).

2.6 OTROS MECANISMOS DE TRANSMISIÓN.

Los primeros antecedentes de la transmisión vertical del binomio madre hijo para VPH, surgen a finales de los años setenta por observación de papilomas laríngeos y condilomas genitales en niños recién nacidos (54), confirmando la factibilidad de este tipo de transmisión en estudios de seguimiento recientemente reportados (55,56). Sin embargo se considera que la tasa de infección en recién nacidos es baja ($\approx 10\%$), aún en mujeres que fueron positivas a la infección viral durante el embarazo (55,57), sobretodo cuando se evalúa la concordancia del mismo tipo viral en la madre y en el hijo.

Por otro lado los hallazgos de una concordancia entre la prevalencia de VPH en lesiones anogenitales y en cavidad oral (58), la presencia de infección en lechos subungueales de las manos y verrugas genitales (59), así como las altas frecuencias de anticuerpos positivos a VPH en niños (60) y la ausencia de asociación de seropositividad a VPH con la actividad sexual, conducen a la posibilidad de una transmisión horizontal por auto o heteroinoculación como sucede cuando una persona infectada la transmite a sí mismo o al tener contacto con otra persona (55,57,60).

2.7 ANTÍGENOS DE LEUCOCITOS HUMANOS. (HLA- HUMAN LEUCOCYTE ANTIGEN).

El HLA (Human Leukocyte Antigen) codifica para las moléculas clase I y clase II que funcionan como elementos que presentan antígenos propios y extraños. Los genes de HLA ocupan una región de cerca de cuatro millones de pares de bases (4Mp), lo cual es equivalente a 0.1% del genoma humano (61). Los genes de HLA se encuentran en el cromosoma 6p21.31, están divididos en regiones de clase I, II y III. Se considera como la región de mayor variabilidad en el genoma humano y tiene un importante papel en la susceptibilidad y resistencia a las enfermedades. Cerca del 30% de los aproximadamente 150 genes expresados codifican para moléculas relacionadas al funcionamiento inmune (61). Los genes de clase I están colocados teloméricamente y codifican las moléculas presentadoras de antígenos HLA-A, B y C. Los genes centroméricos de clase II, codifican para las moléculas

HLA-DP, DR, DQ, pero también para subunidades del proteasoma (LMP) y genes transportadores de péptidos (TAP) (19,62). La región HLA III es una zona heterogénea de genes entre los cuales se encuentran algunos asociados al complemento (C2, C4A, C4B), al proceso inflamatorio (TNF α y TNF β), y al metabolismo de hormonas (21-Ohasa). Se ha propuesto que la región de HLA es una agrupación de genes inmunológicos, tanto como los productos génicos que están involucrados en la generación de la respuesta inmune (63).

Debido al extraordinario polimorfismo de los genes de HLA se han considerados marcadores de individualidad y son de gran ayuda en genética de poblaciones, antropología y el estudio de las enfermedades (64-66). La caracterización genética de una población a través de HLA es necesaria para tener un punto de referencia que permita comparaciones confiables. Algunos estudios en población mestiza mexicana han sido reportados desde 1979 y hasta fechas recientes en un intento de obtener una muestra representativa que permita éste objetivo (66-70).

Las células citotóxicas (CTL) y T cooperadoras (T_H) reconocen péptidos antigénicos procesados presentados por moléculas del CMH clase I o II, respectivamente. Este mecanismo sugiere que las células T pueden monitorear potencialmente cualquier cambio genético, incluyendo aquéllas asociadas con transformaciones (71). El sistema del CMH humano genera una enorme diversidad en presentaciones potenciales de péptidos antigénicos, un fenómeno que incluye

reconocimiento de antígenos tumorales por células T autólogas. La desregulación de HLA clase I es un evento frecuente asociado con desarrollo e invasión tumoral (72). Alteraciones en el fenotipo tumoral de HLA clase I pueden tener profundos efectos sobre la respuesta antitumoral de las células T y las células asesinas naturales (NK-natural killer cells).

2.8 INFECCIÓN POR VPH Y EXPRESIÓN DE HLA.

La infección por VPH de alto riesgo se desarrolla inicialmente en las células basales del epitelio estratificado, donde se realiza la transcripción de los genes tempranos (E-early) E5, E6 y E7, provocando una cascada de expresión de genes de VPH que siguen a la diferenciación de los queratinocitos (73). Una vez que se inicia la migración celular hacia capas más superficiales, de manera concomitante se lleva a cabo la diferenciación de los queratinocitos infectados, expresando los genes tardíos (L-late) del virus y conduciendo a la formación de partículas virales que son exfoliadas a la superficie de la mucosa con capacidad infectiva (74). El genoma de VPHs se mantiene extracromosomalmente o en forma episomal en las células epiteliales, aún cuando en células tumorales infectadas por VPH, se encuentra integrado a los cromosomas de la célula (75).

Los linfocitos T citotóxicos (CTLs) que generalmente son CD8+ (es decir que expresan el receptor CD8 en su superficie celular) juegan un papel importante en la eliminación de las células infectadas por VPH (76). Los antígenos virales son

reconocidos en la superficie de las células infectadas en la forma de cadenas cortas de péptidos (8-10 aminoácidos) unidas a las moléculas del sistema de HLA clase I (77). Las cadenas de péptidos virales son generadas por proteólisis de proteínas virales en el citoplasma y transportadas por complejos peptídicos codificados por los genes TAP-1 y TAP-2, al retículo endoplásmico donde se une a nuevas moléculas sintetizadas de HLA I (78). El complejo formado de HLA-I y el antígeno peptídico viral más la β_2 microglobulina (β_2m) migran a la superficie celular donde ocurre el reconocimiento por los CTL a través de los receptores de las células T (TCR), los cuáles son altamente específicos para el reconocimiento de antígenos (79). Las moléculas del sistema de HLA I son expresadas en la superficie de todas las células nucleadas, por lo tanto los CTLs anti-virales son un mecanismo efector poderoso para la eliminación de las células viralmente infectadas (19). La activación de los CTLs requieren del reconocimiento de antígenos extraños realizado por las células “profesionales” presentadoras de antígenos (APCs), tales como los macrófagos, los linfocitos B y las células dendríticas.

2.9 HLA CLASE II Y LINFOCITOS T COOPERADORES (THLS).

Los THLs generalmente son CD4+ y proveen citocinas para activar a las células B para la producción de anticuerpos, y citocinas para activar y mantener la respuesta para CTL CD8+ (73). Pueden también promover la respuesta inflamatoria, como mecanismo de defensa y a diferencia de las células T CD8+, las células T CD4+

reconocen a los antígenos exógenos, los cuáles son identificados de los alrededores de las APCs por endocitosis o por fagosomas (62). Una vez dentro de la célula, los antígenos son encapsulados en vacuolas llamadas endosomas, las cuales degradan las proteínas en fragmentos peptídicos (11-13 aa de longitud). El bajo pH presente en los endosomas permite la unión con otras vesículas que contienen las moléculas de HLA clase II (76). La expresión de las moléculas de HLA-II se restringen a las células presentadoras de antígenos profesionales. Todas éstas células tienen altos niveles de expresión de HLA-II, son capaces de procesar antígenos exógenos eficientemente, y son ricas en moléculas co-estimuladoras para la activación de células T (80).

El procesamiento y presentación de los antígenos de VPH por la vía de las moléculas de HLA-II puede ocurrir de varias maneras. Teóricamente puede haber una presentación “directa” de los antígenos de VPH, debido a que la mayoría de las células de carcinoma cervical expresan moléculas de HLA II (81). Sin embargo, esto es improbable, ya que debido a que las proteínas génicas tempranas de VPH, son expresadas en el núcleo y en el citoplasma, sugieren que estas proteínas serían preferentemente degradadas en el citoplasma y presentadas por las moléculas de HLA I. También existe la posibilidad de que las proteínas de VPH puedan ser liberadas dentro del espacio extracelular como un resultado de la muerte celular, estos antígenos serían tomados por las APCs y presentadas a las células T locales CD4+. Esto podría ocurrir en el carcinoma cervical y en lesiones de alto grado, ya que se ha observado infiltrados de

linfocitos (82). Sin embargo en lesiones intraepiteliales de bajo grado, se caracterizan por ausencia de inflamación local y ausencia de muerte celular (62).

En el cérvix normal, las moléculas clase II son expresadas por el epitelio columnar pero no por el epitelio escamoso. De 53 carcinomas escamosos cervicales examinados para la expresión de CMH clase II, solo 17% mantuvo un fenotipo negativo característico del epitelio del cual era derivado el tumor. Los subloci DR, DP y DQ del CMH clase II se expresan diferencialmente, lo cual sugiere una regulación independiente (76,83). Así, se ha observado la relevancia que tiene la inmunogenicidad de las células transformadas o infectadas por VPH y el papel de la respuesta inmune son consideradas relevantes en el desarrollo o progresión de malignidad en células cervicales, la cual depende en gran medida de la información genética presente en los antígenos de los leucocitos humanos (71,82).

2.10 ALELOS DE HLA Y CCU

En cáncer cervical y NIC, se han reportado asociaciones con HLA por diferentes grupos de investigadores, obteniendo conclusiones variables, debido principalmente a diferencias en el tipo y tamaño de la población, así como a las técnicas de medición para HLA y VPH y por supuesto a la gran diversidad de polimorfismos en las poblaciones del sistema HLA (84-87).

Está bien documentado la importancia que tienen los CTL a la infección viral por VPH, observando una des-regulación así como pérdida completa en la expresión de los antígenos clase I (88). Tales alteraciones en la expresión de los antígenos clase I hacen posible que las células infectadas por VPH y específicamente para VPH 16 escapen a la detección del sistema inmune (89). Aunque el papel de las moléculas de HLA clase I están bien establecidas en el CC, la importancia del estudio de los alelos individuales de HLA clase I han sido poco explorados. En los estudios donde se aborda el análisis de la frecuencia génicas de éstos alelos se reportan a HLA Cw3 ($p=0.013$) en población de Finlandia (88), a HLA-A2 ($P<0.001$) en población mestizo-mexicana y a Cw*0202 (OR=0.5) en un estudio unificado para poblaciones de Costa Rica y Estados Unidos (90-92).

Por otro lado una mayor atención se observa con los estudios de los antígenos de HLA clase II, a pesar de que no queda claro su regulación en la progresión de la carcinogénesis. Ciertos alelos DQB1 y DRB1 HLA clase II se han asociado con riesgo relativo aumentado para CC en mujeres caucásicas y mujeres afro-americanas (84,85). En la mayoría de los reportes, se encontró una asociación 2 a 7 veces mayor con HLA DQB1*03 y cáncer cervical, mientras que para NIC y VPH el riesgo varió entre 2.5 a 4.0. Para mujeres caucásicas los locus DQB1*03, DRB1*04 y DRB11 estuvieron fuertemente asociados con susceptibilidad a NIC. Específicamente, los haplotipos DRB1*0401-DQB1*0301 y DRB1*1101-DQB1*0301 fueron significativos e indicaron susceptibilidad. El único haplotipo que mostró un efecto protector significativo para NIC y NIC-VPH positivo, en este

estudio fue DRB1*0101-DQB1*0501 (OR=0.48, p=0.01). Se reporta una correlación positiva con NIC-VPH positivo, sugiriendo que alelos específicos de HLA clase II pueden ser importantes en determinar la respuesta inmune a los antígenos de VPH y el riesgo para NIC posterior a infección por VPH (82,92).

En mujeres africo-americanas, se observó un riesgo aumentado para DQB1*0303 (OR=2.7, IC=1.1-7.2), DQB1*0604 (OR=5.2, IC=1.2-31) y un efecto protector para DQB1*0201 (OR=0.5, CI=0.3-0.9) y para el alelo heterocigoto DQB1*0301/*0501 (17 de 214 controles vs. 0 de 66 pacientes con cáncer cervical escamoso OR=0, IC=0-0.7) (85). En mujeres hispánicas residentes de Estados Unidos, los haplotipos DRB1*0404-DQB1*0302, el DRB1*0407-DQB1*0302 y el DRB1*1501-DQB1*0602 son considerados de susceptibilidad por su asociación con CC. Un efecto protector fue observado con DRB1*1101-DQB1*0301 en esta población. Otras variantes de los haplotipos de DQB han sido estudiadas en poblaciones de mujeres germanas, japonesas y noruegas (93-95). En población hondureña el análisis mostró un predominio de HLA-DQA1*0301 al comparar los casos severos, es decir, con NIC III y cáncer invasor, comparado con el grupo control (RR=3.4), mientras que DQA1*0501 sugiere un efecto protector hacia la progresión de la enfermedad al comparar los casos severos y los de NIC I y II (RR = 0.3). El alelo DQB1*0602 mostró un efecto protector para NIC y Cáncer invasor en portadores de VPH 16 y 18 (96). El único estudio reportado en población mexicana muestra que HLA-A2 y HLA-DR5 tuvieron mayores frecuencias, en los casos de cáncer de cérvix con relación al grupo control (OR=4.5 y OR=3.34 respectivamente),

mientras que HLA-DR6 (OR=0.9), HLA-DR2 (OR= 0.05) y HLA-DR1 (OR=0.05) presentaron una menor frecuencia entre los casos (96).

2.11 CÁNCER DE CÉRVIX Y RIESGO GENÉTICO.

Recientemente, se ha señalado evidencia epidemiológica que demuestra una predisposición genética al cáncer cervical. En el trabajo se señala un riesgo de 1.83 (I.C.95%=1.77-1.88) de haber padecido cáncer de cérvix para las madres biológicas de los casos, mientras que para las madres adoptivas el riesgo relativo no fue diferente significativamente de la unidad (1.1, 0.76-1.5). El riesgo relativo para las hermanas biológicas de los casos fue de 1.93 (1.85-2.0), mientras que para las hermanas no biológicas de los casos, el riesgo fue de 1.1 (0.8-1.5). Indicando que hay un riesgo elevado significativo para los familiares biológicos de primer grado de mujeres con cáncer cervical (97).

En otro de los estudios se señala un riesgo de 2.01 (I.C.95%=1.55-2.53) para CC in situ e invasor en madres o hijas de pacientes con CC en relación a controles y sus familiares; aún cuando se encontraron riesgos elevados para otros tipos de cáncer entre las hijas de pacientes con CC como son con Cáncer pulmonar 2.66 (I.C.95%=1.63-4.11), cáncer de piel 2.8 (I.C.95%=1.2-5.51), cáncer en cavidad oral 2.16 (I.C.95%=1.1-3.86), recto 2.40 (I.C.95%=1.03-4.72) y ano 5.36 (I.C.95%=1.46-13.72) (97), estos cuatro últimos sitios de afectación por cáncer, asociados también con infección por VPH (98). Estos resultados han sido

confirmados por otros estudios publicados recientemente, incluso se resalta que el riesgo familiar para el desarrollo de tumores del cérvix contribuye con el 64%, mientras que el componente ambiental corresponde un 36% (99, 100).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se considera que el desarrollo del cáncer de cérvix es una consecuencia tardía de infección persistente del epitelio del cérvix por ciertos tipos de papilomavirus, siendo el más estudiado el VPH 16 por encontrarse presente en más del 50% de los casos (18,36). Se reporta que en el 99% de los casos con CC contienen secuencias de VPH, de las cuáles el 70% están representadas por infección por VPH16 y VPH18 (101,102). Por otro lado se ha observado que mientras 6 a 53% de las mujeres sexualmente activas están infectadas con VPH de alto riesgo, solo 2 a 5% tienen anormalidades cervicales consistentes con infección por VPH (103-104). La discrepancia entre el largo período de latencia de mujeres infectadas y la comparativamente baja frecuencia de CC invasor sugiere que se requiere de otros eventos secundarios y cofactores suficientes para una conversión maligna total de lesiones persistentes (105-106). Se ha sugerido que diferencias en la respuesta inmune a la infección por VPH afecta el curso de la infección para su eliminación o persistencia (107).

El mecanismo por el cual los alelos de HLA afectan la persistencia de la infección y el desarrollo de CC no es todavía claro. Sin embargo se sabe que se despierta

una respuesta inmune ante la presencia viral, debido a la presencia de anticuerpos específicos en el suero de individuos con antecedente de infección, relacionadas con una respuesta iniciada por la presentación antigénica de HLA I (74).

La respuesta inmune celular está evidenciada al observar aumento de riesgo para el desarrollo de neoplasias malignas, incluyendo el CCU, en pacientes con inmunodepresión terapéutica como sucede en los casos de trasplante renal, en quienes se reporta hasta 10.8 veces más posibilidades de desarrollar cáncer en comparación con la población general, lo que sugiere que la respuesta inmune celular tiene un papel importante en la eliminación de la infección por VPH y que estaría representada básicamente por la presencia de HLA II (108,109).

De ahí que parece probable que los individuos varían en su habilidad para presentar epítopes virales al sistema inmune mediado por células T. Individuos portadores de ciertos alelos de HLA, tales como los que se han encontrado asociados con CCU, pueden ser menos capaces de presentar péptidos virales a las células T circulantes; por otro lado la falta de alguno de los alelos de HLA que puede ser característicos de una población podría implicar una falta de respuesta ante estos antígenos (110,111). Tales mecanismos tendrían consecuencias sobre la potencial eficacia de las vacunas como profilácticas contra VPH, en las que se consideren péptidos antigénicos de E6 y E7, ya que esto limitaría una adecuada

eficacia esperada, ahora con la implementación de la vacuna disponible en el mercado, será cuestión de observar sus efectos a largo plazo (74,112).

De acuerdo a los resultados de los estudios que evalúan los haplotipos asociados con CC y lesiones precursoras, se observa que varían dependiendo de la población y grupo étnico que se estudie, en ese caso la población mestizo-mexicana presenta un marco de referencia en la presentación de los HLA clase I y II que los caracterizan y que los distingue de otras poblaciones en el mundo (66-70).

Asimismo el análisis del DNA, principalmente del gen L1 y la región control, de aislados vírales de papilomavirus obtenidos de diferentes países y grupos étnicos, ha permitido detectar que existen variantes en los VPHs que resulta en cierta susceptibilidad poblacional a virus específicos con distribución probablemente regional, incluyendo población mexicana (46-53).

Desde 1986 se ha reportado que el CCU se encuentra significativamente mas frecuente en madres y hermanas de pacientes con CCU que en familiares femeninos de mujeres sin CCU. Este agrupamiento familiar sugiere que algunos de los CCU pueden tener un componente genético primario (113).

De acuerdo con los antecedentes anteriores, existe la posibilidad de que las mujeres mexicanas que desarrollan cáncer cervical presenten cierta susceptibilidad a VPHs con variantes diferentes a las señaladas en otras poblaciones y que pueden estar relacionadas con mayor poder de oncogenicidad, así como también exista una mayor frecuencia de expresión de haplotipos o alelotipos diferentes a las reportadas para poblaciones no mexicanas que confieran mayor riesgo o por el contrario protejan en el desarrollo de cáncer invasor. Por lo que se presenta las siguientes preguntas:

¿Se presenta una asociación entre los alelotipos y/o haplotipos de HLA clase I (A,B), clase II (DR,DQ) con Cáncer Cervicouterino en mujeres mestizo-mexicanas infectadas por VPH16?

¿La presencia de alelotipos y/o haplotipos de riesgo clase I y/o II en las familiares de primer grado de los casos y controles se relaciona con mayor probabilidad de infección por VPH?

4. JUSTIFICACIÓN.

El CC ha permanecido como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad por cáncer en nuestro país en los últimas cuatro décadas. De acuerdo a información de la Secretaría de Salud se reporta que cada minuto, se

diagnosticaban dos casos nuevos de lesiones precursoras de CC, cada 20 minutos se diagnosticaba un caso nuevo de CC en etapa avanzada y cada día morían 11 mujeres por ésta causa (114). Esta situación se mantiene en los países en vías de desarrollo, y han tenido que transcurrir mas de 50 años, posterior a la introducción de la detección oportuna por tamizaje en nuestro país para empezar a observar una disminución en el número de casos de cáncer invasor en el cérvix uterino.

Aún ahora en el interior del País se observan algunas regiones de alto riesgo de morir por ésta causa por el exceso de casos que se presentan con relación al promedio nacional, entre ellas las localizadas en centro y sur de la República (115). La distribución observada es posible que no sea un evento al azar. De acuerdo a los antecedentes presentados, la infección por VPH, no es una causa suficiente para explicar la presencia del cáncer cervical. Características propias del virus, como son su capacidad de integración al genoma humano, la carga viral, los tipos y variedades que obedecen a cierta distribución mundial, son condiciones que influyen en su capacidad de infección, primero, pero también para transformar la célula infectada. Se ha señalado, asimismo, una serie de factores genéticos poblacionales como alteraciones cromosómicas y determinantes del CMH clase I y II, que se relacionan tanto con susceptibilidad como protección a la infección por VPH. Estas características, además de las asociadas con el medio ambiente que pueden favorecer la exposición temprana a la infección (transmisión sexual, transmisión vertical madre-hijo) y los cofactores ambientales (hormonales,

tabaquismo, etc.) permiten que su interacción probablemente favorezcan o no la carcinogénesis.

Los reportes basados en población mexicana, muestran evidencia de algunas de éstas características (91,116-118), los cuáles dan sustento a la posibilidad de explorar con un enfoque epidemiológico, la importancia de algunos factores tanto biológicos por la infección de VPH-AR como del hospedero en su capacidad de respuesta inmune, que aporten mayor información para el desarrollo del cáncer cervicouterino en población mexicana. Esto permitiría identificar el posible impacto sobre determinar a población de alto riesgo que conduzca a una optimización de los recursos en programas de prevención poblacional, específicamente con el impacto esperado con la aplicación de las vacunas profilácticas, ante las evidencias de que la carcinogénesis de CCU esta influenciada, al menos en parte, por el polimorfismo de VPH y de HLA.

5. HIPÓTESIS

Existe una asociación de susceptibilidad ($OR \geq 2.0$) y/o de protección ($OR \leq 0.5$) en uno o mas de los alelotipos y/o haplotipos de HLA clase I y II (HLA-A: A2, A9, A28, HLA-B: B7, B14, HLA-DR: DRB1*05, DRB1*1501, HLA-DQ: DQB1*0602), con Cáncer CC invasor en mujeres mestizo-mexicanas infectadas por VPH 16.

Cuando el familiar femenino de primer grado de la población estudiada (casos y controles) presenta uno o mas de los alelotipos y/o haplotipos de susceptibilidad de HLA clase I y/o II, la probabilidad de presentar VPH de alto riesgo será mayor o igual a 2.0 ($OR \geq 2.0$).

6. OBJETIVO GENERAL:

1. Evaluar la fuerza de asociación de los alelotipos y/o haplotipos de HLA clase I (A, B) y II (DR, DQ) (HLA-A: A2, A9, A28, HLA-B: B7, B14, HLA-DR: DRB1*05, DRB1*1501, HLA-DQ: DQB1*0602), con la presencia de CCU Invasor con infección positiva a VPH16 en población mestizo-mexicana.
2. Determinar la asociación de los alelotipos y/o haplotipos de susceptibilidad de HLA clase I y/o II identificados en la población de casos y controles, con la infección por Virus de papiloma humano de alto riesgo en los familiares de primer grado.

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar diferencias en la frecuencia de alelotipos y/o haplotipos en HLA clase I (A, B) (HLA-A: A2, A9, A28, HLA-B: B7, B14) y clase II (DR, DQ) (HLA-DR: DRB1*05, DRB1*1501, HLA-DQ: DQB1*0602), en los casos y los controles.

2. Identificar la frecuencia de los alelotipos y/o haplotipos de riesgo HLA clase I (HLA-A, HLA-B) y/o II (HLA-DR, HLA-DQ) entre los familiares de primer grado de los casos y de los controles.
3. Describir la frecuencia de infección por VPH-AR (16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/ 58/59/68) en los casos/familiar y en los controles/familiar.
4. Describir la frecuencia de alteraciones epiteliales (Neoplasia Intraepitelial Cervical) en los familiares de primer grado (por antecedente o por hallazgo).
5. Identificar los factores de riesgo sociales (edad, nivel de escolaridad, nivel socio-económico, tabaquismo) y reproductivos (inicio de vida sexual, edad de primer parto, multiparidad, número de compañeros sexuales, uso de anticonceptivos hormonales) para CCU en la población de casos y controles y para Infección por VPH en las familiares de casos y controles.
6. Evaluar características diferenciales de la carga viral por VPH en las pacientes con CCU invasor.

7. MATERIAL Y MÉTODOS.

7.1 LUGARES DE ESTUDIO.

Secretaría de Salud, Hospital General de México. Servicio de Ginecología Oncológica. Hospital de Oncología, Centro Médico Siglo XXI. Servicio de Ginecología Oncológica. Unidades de primer nivel de atención médica en donde se realizan estudios de citología cervical, del área donde se identificaron las casos

de ambas instituciones (SSA-IMSS). El Hospital General de México es una unidad de tercer nivel de atención médica, de alta especialidad en enfermedades oncológicas. A ésta unidad hospitalaria son referidas o acuden por iniciativa propia población de nivel social y económico medio y medio bajo que no cuentan con seguridad social médica. Forma parte del sistema Nacional de Salud, tiene una amplia cobertura en la ciudad de México y en estados colindantes. La clínica de displasias, así como el servicio de Oncología, cuenta con personal especializado para el diagnóstico y tratamiento de lesiones precursoras y cáncer invasor.

Las unidades de primer nivel correspondientes a la Secretaría de Salud, fueron seleccionadas de acuerdo a la mayor cobertura poblacional en función del lugar de residencia de los casos seleccionados que vivían en la ciudad de México, con el fin de identificar controles que residieran en la misma área geográfica que el caso.

El hospital de Oncología del Centro Médico Siglo XXI, es un hospital de tercer nivel que atiende a población derechohabiente, referida para su diagnóstico y/o tratamiento en patología oncológica, principalmente de la clase trabajadora de nivel medio y medio-bajo de la zona sur de la ciudad de México y de algunos estados como son Chiapas, Guerrero, Morelos.

El primer nivel de atención médica, en el IMSS, se encuentra representado por Unidades de Medicina Familiar, las cuáles atienden un promedio de 30 a 40 mujeres diariamente que acuden a realizar el estudio de Papanicolaou (Pap), en el programa de detección oportuna de cáncer, a través de los servicios de Medicina Preventiva. La selección de los controles, se realizó en estas unidades de

acuerdo al área geográfica de donde residía el caso, para disminuir sesgos de selección en los controles, las pacientes fueron invitadas a participar solo en aquellas mujeres que habían acudido como acompañantes o bien que demandaron atención médica en la consulta externa y que no tenían como motivo principal solicitar el estudios de detección de CCU.

El principal motivo para haber considerad hospitales de concentración oncológicos fue tener una mayor población de casos de una enfermedad de baja incidencia poblacional (44 X 100 000 mujeres), además de contar con la posibilidad de una atención médica de alta especialidad, que garantizara un seguimiento de las pacientes. Por otro lado se buscó tener una muestra con mayores posibilidades de representar a población mestiza mexicana con y sin seguridad social, que por otro lado representan casi el total de nuestra población (119).

7.2 DISEÑO DE ESTUDIO:

1. Estudio de Casos y Controles Prolectivo de Casos Incidentes. Este tipo de estudio permitió probar la hipótesis propuesta para buscar asociación de los alelos y/o haplotipos de HLA clases I y II con cáncer de cérvix (120).

Este tipo de diseño de estudio epidemiológico ha sido incorporado en Epidemiología Genética, en función del importante aumento de marcadores

genéticos en diferentes cromosomas relacionados con la presencia de ciertas enfermedades. Este diseño permite evaluar si una enfermedad, en este caso el cáncer de cérvix invasor cosegrega con un marcador específico (HLA I y II) en pacientes consideradas de alto riesgo. Su principal ventaja es que estos estudios pueden indicar la localización en un cromosoma de genes de susceptibilidad (o protección) a la enfermedad.

Este diseño tiene algunas ventajas para el estudio de marcadores genéticos, en primer lugar se considera un diseño eficiente para el estudio de enfermedades de baja frecuencia, por otro lado se considera que el estudio de genes específicos, representan marcadores estables indicadores de susceptibilidad en el huésped, además de que es posible medir el efecto de interacciones genético-ambientales (121).

2. Para el segundo problema aplicable a las mujeres familiares de primer grado tanto de casos como de controles, se realizó un estudio Transversal Analítico, en el que la exposición se consideró como la identificación de los alelotipos o bien haplotipos de HLA de riesgo para cáncer de cérvix y el efecto fue la identificación de infección por virus de papiloma humano de alto riesgo, los cuales fueron medidos en el mismo momento de selección (122).

7.3 POBLACIÓN DE ESTUDIO:

Mujeres mestizas mexicanas con y sin diagnóstico de Cáncer de Cérvix Invasor y un familiar del sexo femenino de primer grado.

CASOS: Mujeres con diagnóstico de Cáncer de cérvix invasor, de reciente diagnóstico, etapas clínicas I a IV, que no hubieran iniciado tratamiento y un familiar femenino de primer grado (madre, hija o hermana).

Criterios de Inclusión: Diagnóstico histopatológico de Cáncer Primario de cérvix invasor, positiva a VPH16, en cualquier etapa clínica, de cualquier edad, que se considere como población mestizo-mexicana (nacimiento de los familiares de tres generaciones en México), que tengan un familiar de primer grado femenina, que hayan iniciado vida sexual, y que ambas el caso y familiar acepten la participación voluntaria, que sean residentes del área metropolitana.

Criterios de Exclusión: VIH positivo, embarazo.

Criterios de Eliminación: Falta completa de muestras biológicas en el caso y/o familiar.

CONTROLES: Mujeres sin diagnóstico de cáncer cervicouterino, ni lesiones precursoras, con antecedente de Papanicolaou negativo a neoplasia al momento de la entrevista, o negativas a sintomatología cervico-vaginal, negativa a VPH de

alto riesgo, pareadas por frecuencias en grupos de edad ± 5 años en relación a los casos.

Criterios de inclusión: Población mestizo-mexicana (nacimiento de los familiares de tres generaciones en México), edad ± 5 años con relación a los casos, de la misma área geográfica (delegaciones políticas) que los casos, que hubieran acudido a la demanda de atención médica en el primer nivel de atención como acompañantes, que cuenten con un familiar de sexo femenino de primer grado que haya iniciado vida sexual y que ambas acepten participar en el estudio.

Criterios de exclusión: VIH positivo, nacionalidad extranjera en las tres generaciones previas, negativa de participación de ella o del familiar de primer grado, embarazo.

Criterios de Eliminación: Muestras biológicas incompletas del control y/o del familiar.

7.4 MARCO MUESTRAL.

La población mestiza mexicana se define como los descendientes de una mezcla de habitantes autóctonos con otros grupos étnicos, principalmente de habla hispana y en menor grado de raza negra, los cuales constituyen más del 90% de la población (119). Con el fin de identificar población de casos y controles que cumplieran con éstas características se consideró en la entrevista los

antecedentes de nacimiento de los padres y abuelos, minimizando de ésta manera la posibilidad de un error en la selección de la población fuente.

Los casos fueron seleccionados a partir de la detección de mujeres con Papanicolaou Clase V que fueron referidas para diagnóstico de CC invasor, en cualquier etapa clínica y a quién se le planteó la posibilidad de estudiar a una de sus familiares, estas pacientes fueron captadas en las unidades de referencia correspondientes. En el caso de la Secretaría de Salud, en el Servicio de Ginecología Oncológica del Instituto Nacional de Cancerología y del Hospital General de México. En el IMSS, se detectaron las pacientes referidas para su diagnóstico al servicio de Ginecología Oncológica del Hospital de Oncología, CMN Siglo XXI.

Los controles fueron seleccionados de las unidades de primer nivel de atención médica correspondiente al área geográfica por delegación política en donde residía el caso y donde se realizó el programa de detección oportuna de cáncer cervical.

7.4.1 TAMAÑO DE MUESTRA.

Para la búsqueda de diferencias en la frecuencia de alelotipos y/o haplotipos de HLA que indicaran susceptibilidad a la infección por VPH de alto riesgo

relacionada con el cáncer de cérvix en relación con el grupo control, nivel de confianza del 95%, poder de la prueba de 80%, y una asociación mínima de 2 (frecuencia de HLA-B35=27.5% en casos vs. 13.3% en controles) (91,96), el tamaño muestral calculado fue de 117 casos y 117 controles. El cálculo del tamaño muestral fue calculado con la siguiente fórmula:

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 p (1-p) (r+1)}{(d)^2 r}$$

donde:

—

$$p = (p_1 + r p_2) / (1+r)$$

p_1 = proporción de exposición entre los casos

p_2 = proporción de exposición entre los controles

r = razón de casos y controles 1:1

d = diferencia esperada entre los casos y los controles

En familiares fueron considerados un nivel de confianza del 95%, un poder de 80%, una diferencia esperada de 0.48, se obtuvo una muestra teórica de $n_0' y 1' = 98$; sin embargo debido a que cada caso o control tendrá un familiar el tamaño muestral será ajustado al tamaño muestral anteriormente calculado. $n_0' = 117$; $n_1' = 117$ (+10% de posibles pérdidas – eliminadas).

El promedio de hijas entre los casos es de 2.1 ± 1.1 de acuerdo a un estudio piloto entre las mujeres con CC y el promedio poblacional de hijas por familia es de 1.5, de acuerdo a datos estadísticos del censo de población y vivienda en México (119). Estimando una tasa de respuesta entre los familiares de los casos de 95%, se obtendría una submuestra en familiares de 98, mientras que la tasa esperada de respuesta en el grupo control será de 85% con un total estimado de 99 familiares de controles.

Se consideró una cuota similar de casos con CCU invasor positivas a VPH16 por centro participante (IMSS-SSA) (50% aproximadamente). Para captar a las pacientes con CCU invasor con infección positiva a VPH 16 ($n=117 \pm 12=129$), y considerando una probabilidad de encontrar pacientes con esta característica en 0.5, necesitamos determinar VPH en al menos 248 pacientes que cumplan los criterios de inclusión.

7.5 VARIABLES.

Problema 1.

Variable Dependiente.

Cáncer cervical invasor positiva a VPH 16. Neoplasia maligna localizada en el cuello del útero con invasión a tejidos adyacentes en cualquier grado, de acuerdo a los criterios de la FIGO y que tengan identificación positiva a VPH tipo 16. El diagnóstico será realizado con el estudio histopatológico en tejido de biopsia o bien en tejido de pieza quirúrgica, el cuál será leído por dos médicos patólogos en forma independiente.

Mujeres control sin cáncer invasor negativas a VPH 16. Mujeres que en la citología cervical no se encuentren datos de neoplasia intraepitelial o cáncer invasor, en el estudio analizado por el médico patólogo, con antecedentes personales negativos a cualquier neoplasia.

Escala: Cualitativa. Categorías: Presente (Casos), Ausente (controles).

Variable Independiente.

Alelos de HLA clase I (HLA-A, HLA-B) y clase II (HLA-DR y HLA-DQ).

HLA (Human Leucocyte Antigen). HLA clase I y II son las dos principales moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC - Major Histocompatibility Complex), son heterodímeros transmembranales cuyo dominio extracelular amino-terminal atrae antígenos para presentarlos a las Células T. Hay tres tipos de proteínas clase I, HLA-A, HLA-B y HLA-C y tres tipos clase II, HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR. Los genes que codifican para HLA clase I y II, se

encuentran en el cromosoma 6. Se realizará el análisis de la distribución de los alelos para clase I y II, determinados en DNA de leucocitos en sangre periférica. Haplotipos de HLA. Se refiere a la combinación de alelos de HLA ligados a múltiples loci que se transmiten juntos.

Problema 2.

Variable Dependiente: Virus de Papiloma Humano de alto riesgo.

Variable Independiente: Alelos y/o haplotipos de HLA clase I (HLA-A, HLA-B) y clase II (HLA-DR, HLA-DQB1).

7.5.1 DEFINICIÓN OPERATIVA DE LAS VARIABLES

Problema 1.

Cáncer de Cérvix. Diagnóstico definitivo realizado con el estudio histopatológico en tejido de biopsia o bien en tejido de pieza quirúrgica, obtenido por acuerdo interobservador entre dos médicos patólogos que lo evaluaron en forma independiente.

Alelos de HLA. Determinación positiva por bandeo de acuerdo al método de hibridización in situ en el DNA de leucocitos de sangre periférica.

Problema 2.

Virus de papiloma humano de alto riesgo. Determinación positiva / negativa, de acuerdo al método de captura de híbridos II (Razón RLU control / muestra >1)

Alelos de HLA. Determinación positiva / negativa, por bandeado de acuerdo al método de hibridización in situ en el DNA de leucocitos de sangre periférica.

OTRAS VARIABLES (potencialmente confusoras).

Para los problemas 1 y 2.

Sociodemográficas: edad, nivel socioeconómico, escolaridad y hábito tabáquico.

Reproductivas: edad de inicio de vida sexual, edad del primer parto, número de partos, número de cesáreas, número de compañeros sexuales, uso de anticonceptivos orales.

La definición de las variables se muestran en el Anexo 1.

8. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

8.1 PRUEBA PILOTO:

Se diseñó un cuestionario (anexos 2,3) con la información de las variables de estudio. La prueba piloto se conformó con una muestra de la población de estudio ($n_0=20$, $n_1=20$), para ver la factibilidad y la validación del contenido del cuestionario, así como el tiempo que se requería con cada paciente para

responderlo, el cual fue en promedio de 22 minutos. Aproximadamente el 20% de las preguntas fueron modificadas, en redacción, en las opciones de respuesta y en aquellas que eran redundantes. La validez interna de las preguntas en el cuestionario fueron evaluadas con coeficientes de correlación (t Kendall=0.89). El grupo de monitores fueron capacitados para evitar sesgos en la recolección de la información.

8.2 RECOLECCIÓN DE DATOS.

La primera fase del estudio fue obtener la información de las pacientes con cáncer cervicouterino, que habían sido referidas para su atención médica a las dos unidades hospitalarias. Las pacientes ingresaban al estudio una vez que cumplían criterios de inclusión y aceptaban la participación de un familiar de primer grado.

Un grupo de trabajadoras sociales fueron las encargadas de identificar a la población que cumpliera los criterios de inclusión, bajo la supervisión de una enfermera encargada de trabajo de campo. Las pacientes fueron captadas en los módulos de consulta externa cuando solicitaban atención médica de primera vez para los diagnósticos de interés, se solicitó el consentimiento de la paciente, informándole de las características que tendría y la necesidad de que un familiar participara de manera voluntaria. y se pidió que firmaran el documento que lo avalara (anexo 4). Una vez firmada la carta de consentimiento, se llevó a cabo la entrevista y se concertó una cita para los familiares que no se encontraban en ese momento.

El personal de enfermería fue el encargado de obtener las muestras biológicas y dar la orientación de seguimiento. Todo el personal de salud participante fue previamente capacitado y elegido para realizar éstas actividades (anexos 5,6).

Una vez que se tuvo el número total de casos se identificó el número de pacientes por delegación política en el área metropolitana y por tipo de seguridad social. De ésta manera nos permitió identificar conglomerados de casos de acuerdo a su domicilio y se pudo optar por la selección de las unidades de primer nivel en donde se invitaría a participar a las mujeres con altas probabilidades de no tener cáncer o lesiones precursoras.

8.3 MÉTODO DE RECOLECCIÓN DE MUESTRAS PARA VIRUS DE PAPILOMA HUMANO.

La muestra fue tomada con cytobrush, se realizó el extendido en dos laminillas limpias (una para el estudio, otra para el servicio de patología). Las preparaciones fueron fijadas, identificadas y almacenadas para su estudio. La toma de muestra para el frotis de Papanicolaou se realizó antes de obtener la muestra para los análisis de DNA. Se eliminará el moco sobrante del orificio cervical y ectocérvix circundante utilizando una torunda de algodón o Dacrón. Para la toma de muestra en las determinaciones virales, se utilizó un cepillo cervical marca Digene. La introducción del cepillo se realizó a una profundidad de 1 a 1.5 cm., hasta que las cerdas externas más largas del cepillo tocaron el ectocérvix. El cepillo se giró tres veces en sentido antihorario, sin insertar el cepillo completo en el canal cervical. Al

sacar el cepillo se evitó el contacto entre las cerdas del cepillo y la parte externa del tubo u otro objeto. Posteriormente se introdujo el cepillo en el fondo del tubo de transporte, rompiendo la varilla en la línea delimitada y, cerrándolo bien. La muestra fue colocada en una rejilla, manteniéndola a temperatura ambiente hasta enviarla a la red fría junto con las otras muestras recolectadas del día.

8.4 DETERMINACION DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.

La identificación y tipificación del VPH fue realizada en el laboratorio de biología molecular. Se utilizó la prueba de Digene para VPH, usando la tecnología de captura de híbridos II, la cual consiste en un ensayo en microplaca de señal amplificada de hibridación, usando quimioluminiscencia para la detección cualitativa de 18 tipos de DNA de papilomavirus humano en muestras cervicales. Esta prueba puede diferenciar entre dos grupos de DNA-VPH: los tipos VPH de bajo riesgo 6/11/42/43/44; y los tipos de VPH de intermedio y alto riesgo 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68 (123,124).

Antes de iniciar el proceso el tubo de transporte se dejó a temperatura ambiente durante 30'. Se preparó el agente de desnaturalización agregando 5 gotas de *Indicator Dye* y se mezcló vigorosamente hasta alcanzar un color homogéneo púrpura. Se agregaron 500µl de ésta solución de *Hidróxido de Sodio (NaOH)* diluida, al tubo colector de la muestra. Se dejó durante 45' a 65°C. Se preparó la prueba cocktail para VPH, centrifugando el vial, fue determinada la cantidad de

Probe Mix requerida (25µl/test). Se realiza una dilución 1:25 de la prueba de VPH A y el *Probe Diluent* para preparar el *Probe Mix*. Fueron colocados 25µl de la solución en cada microtubo, y colocados en el vortex por 5 ''. Setenta y cinco µl de cada muestra fue colocada en un microtubo de hibridización, y cubierta para centrifugación a $1,100 \pm 100$ rpm por 3 ± 2 min. Las muestras fueron transferidas a los micropozos de captura correspondiente, usando un set de pipetas a 8 canales de 100µl, las microplacas fueron cubiertas y colocadas en *un Rotary Shaker* a 1100 ± 100 rpm, a 20-25°C durante una hora. Se vaciaron 75µl del reactivo de detección 1 (anticuerpo fosfatasa alcalina) en cada pozo de la microplaca de captura, usando una pipeta de 8 canales. Las placas se cubrieron e incubaron a 20-25 °C durante 30 ± 3 minutos. En la fase de lavado se usó el Digene's Wash Apparatus el cual realiza el lavado empezando en A1 y continúa en forma de S hacia la derecha y abajo, en 2 ciclos, después inicia en forma inversa y así hasta completar 6 ciclos. Se colocaron 75µl del Reactivo de Detección 2 (CDP-star smerald, sustrato quimioluminiscente) en cada pozo de la microplaca de captura, los pozos al adquirir un color amarillo, se cubrieron e incubaron a 20-25°C durante 15 min. La lectura se realizó en el Luminómetro DML 2000.

El DNA contenido en las muestras hibridiza con el RNA específico de VPH en una prueba cocktail. Los híbridos resultantes de RNA:DNA son capturados en la superficie de una microplaca cubierta con anticuerpos específicos para los Híbridos RNA:DNA. Los híbridos inmovilizados reaccionan entonces con

anticuerpos específicos para híbridos de RNA:DNA, conjugados con fosfatasa alcalina y detectados con sustrato quimioluminiscente. Algunas de las moléculas de fosfatasa alcalina son conjugadas a cada anticuerpo. Múltiples anticuerpos conjugados unen a cada híbrido capturado resultando en una señal substancial de amplificación. Como el sustrato es dividido por la unión de la fosfatasa alcalina, la luz emitida es medida como unidades de luz relativas (RLUs) en un luminómetro. La intensidad de la luz emitida denota la presencia o ausencia de DNA en la muestra (124,125).

8.5 DETERMINACION DE HLA

Las muestras sanguíneas venosas fueron obtenidas de los casos-familiar y los controles-familiar. La muestra de 2 a 3 ml. de sangre periférica se obtuvo con tubos de Vacoutainer, se identificaron y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su traslado al laboratorio de inmunogenética. El DNA genómico de sangre total conteniendo EDTA (Acido di-etil-amino-tetra-acético) fue extraído por técnicas estandarizadas (BD tract Genomic DNA Isolation Kit) en leucocitos de sangre periférica (126) (Anexo 7). La tipificación de HLA-A, B, DR, y DQB1 fueron realizadas a través del método de PCR-SSO reverse dot blot (PCR-SSO polymerase chain reaction- sequence-sensitive-oligonucleotide), usando el kit comercial Dynal RELI™ SSO HLA (Dynal Biotech Ltd, United Kingdom).

La amplificación de HLA A, B, DR, y DQB1 fueron realizados usando Taq DNA polimerasa (Promega, Madison, Wis). Los primers para amplificación de HLA A, B fueron detectados para las regiones del exón 2 y 3 en todos los casos. Para el ensayo de HLA DRB1, un par de primers amplificaron el sitio de DNA específico contenido en los motifs de la secuencia polimórfica en el exón 2 del RB1; cada secuencia específica tiene una longitud de 272 pares de bases. Para el ensayo HLA DQB1, la secuencia de DNA blanco específica fue el exón 2 polimórfico del gen DQB1; la secuencia blanco era aproximadamente de 300 pares de bases de longitud.

Amplificación de DNA genómico: La tipificación de HLA clase II será realizada por Hibridización Dot Blot: Cinco por ciento del DNA amplificado será desnaturalizado en 0.4 mol/l NaOH, 10 min, neutralizados en 1 mol/l de acetato de amonio y transferido a una membrana Hybond-N (Amersham, Bucks, UK). Los filtros serán pre-hibridizados a 43° C durante 30 min. En una solución conteniendo 6X SSPE (30X SSPE: 4.5 mol/l NaCl, 0.3 mol/l NaH₂PO₄, 30 mmol/l EDTA, PH=7.4), 5X solución de Denhard (2% de albúmina de suero bovino, 2% de poli-vinyl-pirrolidona 40, 2% Ficoll 400), 0.1% Lauril-sarcosina y 0.02% SDS. La pruebas de oligonucleótidos serán etiquetadas con Digoxigenin (di-deoxi-uridin-trifosfato: dig-11-ddUTP) serán añadidos e hibridizados a 42°C por 3 Hrs. Los filtros serán lavados dos veces en 2XSSPE, 0.1% SDS a temperatura ambiente por 10min, una vez en solución TMAC (50 mmol/l Tris-HCl, pH=8.0, 3 mol/l de clorato de tetrametil-amonio, 2 mmol/l EDTA, 0.1% SDS) a temperatura ambiente, por 10 min, y

dos veces a 60°C por 10 min. Los resultados serán revelados usando el Kit Dig Nucleic Acid Detection (Boehringer Mannheim Biochemical, Mannheim Biochemical, Germany).

Brevemente, la muestra de DNA fue amplificada usando primers específicos de PCR. Los productos amplificados se hibridaron en una serie de pruebas inmobilizadas de SSO. Las pruebas de secuencias -sensibles de oligonucleótidos fueron diseñadas para hibridar secuencias de blancos polimórficos de HLA. La inmovilización de éstas pruebas se conoce como una línea blot reversa (RELI). La detección de productos amplificados por la unión de pruebas (complejo Amplicon-prueba) fue llevada a cabo por formación colorimétrica (precipitado azul). Los HLA A, B, DR1 y DQB1 para las muestras de pacientes se interpretan usando el programa de patrones pareados provista por Biotech Dynal GmbH (Hamburgo, Alemania).

9. PLAN DE ANÁLISIS:

El análisis de los datos se realizó de acuerdo a los objetivos e hipótesis del trabajo y al tipo de variables. Se recolectó la información de los cuestionarios que se obtuvo de las entrevistas y de la revisión de los expedientes clínicos, así como los resultados histopatológicos, de la captura de híbridos y de los alelos de HLA.

Se realizará una base de datos en el programa S.P.S.S.v.15 (Statistical Package of Social Sciences) (127), dicha información fue validada por medio de doble captura de información y por frecuencias simples.

PROBLEMA 1.

El análisis estadístico fue conducido en cuatro partes. Inicialmente, estadística descriptiva para todas las variables usando medias y desviación estándar para variables cuantitativas y porcentajes para las cualitativas. El análisis comparativo entre casos y controles con respecto a las variables clínicas y reproductivas, utilizando chi cuadrada, con un nivel de confianza del 95%.

Segundo, se realizó una prueba exacta de equilibrio de Hardy-Weinberg y la estimación esperada por Maxima-Verosimilitud de haplotipos utilizando el programa Arlequín v3.01 (un programa computacional integrado para el análisis de genética de poblaciones) (128). Este algoritmo fue utilizado para determinar la asignación de frecuencias de haplotipos con una configuración *cis* y fase desconocida. La prueba de razón de verosimilitud de desequilibrio de ligamiento entre HLA A, B, DRB1 y DQB1, fueron también estimados asumiendo un equilibrio de ligamiento.

Tercero, se identificaron 15 HLA-A, 26 HLA-B, 12 HLA-DRB1, 11 HLA-DQB1 alelos y 133 HLA A-B-DRB1-DQB1 haplotipos en pacientes con cáncer de cérvix, mientras que en controles se encontraron 13 HLA-A, 20 HLA-B, 13 HLA-DRB1, 8 HLA-DQB1 alelos y 122 HLA A-B-DRB1-DQB1 haplotipos. De todos los alelos y haplotipos encontrados, fueron seleccionados aquéllos en los que se mostraron diferencias en las frecuencias entre los grupos de casos y controles sin cáncer, utilizando una prueba exacta de chi cuadrada y calculando la razón de momios u odds ratio (OR), con los respectivos intervalos de confianza (EpiMax table calculator program (<http://www.healthstrategy.com/epiper/html>);). El cálculo de OR conferido por un genotipo/haplotipo de HLA fue conducido por el método de Woolf o por el método modificado de Haldane cuando ciertas frecuencias en las celdas de las tablas de 2x2 son muy pequeñas o incluso con valores cero (129).

Cuarto, para evitar un error tipo 1 cuando se realizan comparaciones múltiples independientes y cuando todos los genotipos examinados poseen la misma oportunidad de estar disminuidos o bien aumentados, se utilizó un valor de P corregido por el número de comparaciones (método de desigualdad de Bonferroni) (130). La corrección precisa fue obtenida por medio de la siguiente fórmula:

$$P_{corrected} = 1 - (1 - P)^n$$

Dónde P es el valor de P no corregido y n es el número de comparaciones. El número utilizado para corrección fue el número de comparaciones, una o más de

las cuáles mostraron un resultado significativo. Todas las pruebas estadísticas fueron consideradas estadísticamente significativas con un valor de $p < 0.05$.

PROBLEMA 2.

De manera similar al problema uno la información recolectada de los cuestionarios fue capturada en una base de datos del software SPSS) y la validación de los datos fue realizada por doble captura (20% de la información) y por frecuencias simples. Se realizó análisis descriptivo de las variables de interés a través de medidas de tendencia central, de dispersión o porcentajes, de acuerdo al tipo de variable. El análisis bivariado se realizó en función primero de probar diferencias en las variables sociales y demográficas respecto a la frecuencia de infección por VPH en las familiares de mujeres con y sin CCU, aplicando la prueba estadística de χ^2 , y como medidas de asociación razones de momios con los respectivos intervalos de confianza al 95%.

Los alelos y/o haplotipos identificados con asociación significativa entre los casos y controles fueron analizados como variable independiente en la relación con infección por VPH alto riesgo. Las variables potencialmente confusoras fueron analizadas para conocer primero su posible asociación con la exposición o con el efecto. Asimismo se exploró el comportamiento de las variables de acuerdo al tipo de población estudiada, es decir, de acuerdo al tipo de familiar, utilizando los estadísticos de Mantel-Haenszel. Finalmente se identificaron las asociaciones

ajustadas por regresión logística no condicionada, considerando significativa una probabilidad < 0.05 .

10. CONSIDERACIONES ÉTICAS:

10.1 COMITÉS DE ETICA E INVESTIGACIÓN.

Este trabajo fue aprobado por los comités de ética e investigación de los siguientes lugares:

- 1) Unidad Médica de Alta especialidad (UMAE). Hospital de Oncología. 09HO00 (Anexo 8).
- 2) Instituto Nacional de Cancerología. 000161CI (Anexo 9).
- 3) Departamento del Distrito Federal. Centro de Atención Médica. 1110110602 (Anexo 10).

10.2 ASPECTOS ÉTICOS Y CONFIDENCIALIDAD

Contemplado en la Ley General de Salud 2002. Artículo 100: Las investigaciones en seres humanos. IV Se deberá contar con el consentimiento por escrito del sujeto en quien se realizará la investigación o de su representante legal en caso de incapacidad legal de aquel una vez enterado de los objetivos de la experimentación y de las posibles consecuencias positivas o negativas para su salud. La toma de muestras biológicas como el de citología cervical y la muestra sanguínea, representan intervenciones de bajo riesgo, por lo que para disminuir la

probabilidad de cualquier efecto negativo, se realizó un apego a las técnicas de acuerdo a lo propuesto en la metodología del proyecto. A todas las pacientes se les informó de los objetivos del estudio y explico los posibles riesgos y beneficios potenciales al invitarlas a participar en el estudio y se pidió firmaran una carta de consentimiento (Anexo 4). Asimismo se comento que no habría afectación a su atención médica si decidiera no participar, y que el manejo de la información sería confidencial y con fines científicos.

11. RESULTADOS.

En relación al tamaño mínimo de muestra estimado se requerían 248 participantes por cada grupo, pacientes con CCU, mujeres sin neoplasia y los respectivos familiares. Durante el período de junio del 2000 al mes de agosto de 2004, un total de 1200 mujeres aceptaron participar en el estudio (300 por grupo), sin embargo fueron eliminadas 150 de ellas, básicamente por no contar con las determinaciones de VPH, pero además por no cumplir con las citas para la toma de muestra (26%), por no tener determinaciones confiables de virus de papiloma humano (21%), por haber identificado alteraciones en la citología vaginal (18%, ASCUS, lesiones de bajo y alto grado, atrofia, muestras insuficientes) o bien por no contar con muestra biológica (20%) o ser insuficiente para la extracción de DNA en sangre periférica (15%), tanto en controles como en las familiares.

Así el grupo de estudio quedó conformado por un total de 1050 mujeres en quienes tuvimos resultados de VPH alto riesgo para realizar la selección de casos con CCU e infección de VPH 16 (285 casos con CCU, 277 controles, 221 familiares de pacientes con cáncer y 267 familiares de mujeres sin cáncer). En la tabla 1 se observa además la distribución de la población de estudio de acuerdo a las clínicas participantes. De las 285 pacientes con CCU, 6 fueron negativas a VPH (2.1%), 140 (49.1%) fueron positivas a VPH16, grupo blanco de interés para este estudio, mientras que 139 fueron positivas a otros tipos de VPH (48.8%). La prevalencia de infección por VPH de alto riesgo en mujeres control, en las

familiares de casos y en familiares de controles fue de 9% (25/277), 18.1% (40/221) y de 16.5% (44/267) respectivamente (Tabla 1).

Para realizar las determinaciones de HLA, del total de pacientes con CCU positivas a VPH16 (n=140), se eligieron aleatoriamente 104 pacientes y un número similar de controles (negativas a VPH) (89% del estimado muestral). En los familiares se eligió una muestra de 54 mujeres, 27 de cada grupo, con y sin cáncer, independiente de la condición de infección a VPH y HLA.

11.1 RESULTADOS PROBLEMA 1.

En la tabla 2 se muestra el comportamiento de las variables sociales y reproductivas entre las mujeres con cáncer de cérvix y controles ($n_0=277$; $n_1=285$). La media de la edad en las pacientes con CCU fue de 52.7 ± 12 y en las mujeres sin cáncer fue de 50.0 ± 11 , de acuerdo a los grupos de edad mostrado en la tabla no hay diferencias significativas entre los casos y controles. En los casos hubo un mayor número de mujeres sin pareja, con ocupación principal el hogar, con edad temprana de inicio de vida sexual, más de tres partos, y con más de una pareja sexual ($p<0.05$). No se observaron diferencias para las frecuencias de hábito tabáquico, ni para el uso de anticonceptivos orales.

Respecto a la muestra seleccionada de casos y controles ($n_{00}=104$; $n_{11}=104$), no se observaron diferencias estadísticas en las características sociodemográficas entre las pacientes con cáncer y mujeres control de la población analizada para HLA, sin embargo se diferenciaron en las variables de tipo reproductivo como la edad de inicio de vida sexual menor a 18 años y haber tenido el antecedente de tres o mas partos ($p=0.001$).

En las pacientes con CCU, las etapas clínicas IIa y IIb fueron las mas frecuentes ($\approx 50\%$), mientras que la etapa IV fue la menos representada ($<6\%$). La mediana de carga viral en todos los casos fue de 108.43 RLUs, valor mínimo 1.06, valor máximo de 3463.72, $q_1=16.33$ RLUs, $q_3= 759.82$ RLUs; mientras que en la muestra seleccionada con VPH16 la mediana fue de 174.4 RLUs, $q_1=16.14$ y $q_3=873.1$ RLUs, mismos valores mínimo y máximo.

Los valores de las frecuencias genotípicas observadas y esperadas para los loci HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 y HLA-DQB1 no difirieron significativamente, y la población se mantuvo en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p>0.05$). Los resultados del análisis de la distribución de frecuencias para HLA clase I (HLA-A,B) se presentan en la tabla 3. Los alelos de HLA-A mas frecuentes fueron HLA-A2, HLA-A24 y HLA-A68 con frecuencias similares entre las pacientes con y sin cáncer (HLA-A2: 0.3317, 0.3382; HLA-A24: 0.2066, 0.1862; y HLA-A68: 0.1635, 0.1568, respectivamente) ($p>0.05$).

Los antígenos de histocompatibilidad clase I, HLA-B fueron los que presentaron mayor polimorfismo, identificando 26 tipos diferentes. El de mayor frecuencia fue HLA-B35 con un porcentaje de 0.1971 en casos y 0.2452 en controles ($p=0.07$). Se observaron diferencias significativas entre grupos de casos y controles para HLA-B39 (OR=0.41, IC95%=0.2-0.8; p corregida = 0.02), y HLA-B18 (OR=4.2, IC95%=1.8-9.6; p corregida = 0.001). De manera interesante se observó que los alelos HLA-A11 (fg=0.0192), HLA-A36 (fg=0.0096), HLA-A34 (fg=0.0048), HLA-B38 (fg=0.0144), HLA-B41 (fg=0.0096), HLA-B47 (fg=0.0096), HLA-B29 (fg=0.0048), HLA-B55 (fg=0.0048) y HLA-B57 (fg=0.0048) solo fueron identificados en los casos con CCU, mientras que un solo alelo HLA-A33 (fg=0.0098) se observó en controles.

Los resultados reportados en la tabla 4 muestran las frecuencias para los alelos de HLA clase II, en donde se observa que HLA-DRB1*04 y HLA-DQB1*04, los cuales se conoce que están en desequilibrio de ligamiento, estuvieron presentes en cerca de un tercio tanto de pacientes con cáncer como las mujeres control. Un comportamiento similar fue observado con las frecuencias para HLA-DRB1*08 (fg=0.1971, fg=0.2452) y HLA-DQB1*0402 (fg=0.2067, fg=0.2402). La presencia de HLA-DRB1*15 se encontró estar asociado con CCU (OR:3.9, IC95%=1.6-10.2; p corregida = 0.002). Tres alelos, HLA-DQB1*0604 (fg=0.0096), HLA-DQB1*0304 (fg=0-0048) y HLA-DQB1*0503 (fg=0.0048) se observaron solo en los casos, mientras que HLA-DRB1*09 (fg=0048) se identificó en uno solo de los controles (tabla 4).

Los haplotipos estimados HLA-A/B, HLA-A/DR, HLA-A/DQ, HLA-B/DR, HLA-B/DQ y HLA-DR/DQ que presentaron diferencias significativas se muestran en la tabla 5. Los haplotipos HLA-A2/B18, HLA-A24/B15, HLA-A1/DR13, HLA-A2/DQB*0501 y HLA-DR15/DQB*0602 presentaron frecuencias mas altas en los casos que en los controles (OR >1). Podemos observar que excepto para HLA-DR15/DQB*0602, todos estuvieron positivamente asociados con CCU solo en forma de haplotipos; además los haplotipos HLA-A24/B15 y HLA-A1/DR13 se observaron solamente en los casos de CCU y no en los controles. Por otro lado, los haplotipos HLA A2/B39, HLA-A24/B39 y HLA-B35/DR8 estuvieron negativamente asociado con CCU (OR <1).

Se estimaron las combinaciones haplotípicas mas probables con HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 y HLA-DQB1, después de obtener los valores de p corregidos, los haplotipos HLA-A2-B39-DR4-DQB1*0302 (OR=0.16, IC95%=0.04-0.06), HLA-A24-B35-DR4-DQB1*0302 (OR=0.05, IC95%=0-003-0-39) y HLA-A68-B40-DR4-DQB1*0302 (OR=0.06, IC95%=0-003-0-45) estuvieron asociados negativamente con CCU. Por otro lado los haplotipos HLA-A2-B44-DR4-DQB1*0302 (OR=11.5, CI95%= 1.5-2.44), HLA-A24-B35-DR16-DQB1*0301 (OR=11.5, IC95%=1.5-244) y HLA-A2-B40-DR4-DQB1*0302 (OR=4.6, IC95%=1.2-20.4) mostraron una asociación de riesgo con CCU (OR>1) Tabla 6.

Al explorar algunas características clínicas en mujeres con CCU y los haplotipos de HLA, no encontramos diferencias entre los haplotipos de riesgo y la edad al diagnóstico, etapa clínica o riesgo de morir en tres años de seguimiento. Sin embargo, observamos una asociación significativa entre los haplotipos HLA-A1/DR13 y HLA-A24/B15 con carga viral del VPH16. Este hallazgo se muestra en el gráfico 1.

11.2 RESULTADOS PROBLEMA 2.

La población para el análisis de los datos estuvo conformada por 221 familiares en primer grado de mujeres con CCU de reciente diagnóstico y por 267 familiares de primer grado de mujeres sin esta neoplasia. Del total de mujeres participantes (488), el mayor porcentaje estuvo representado por las hijas (331=67.8%), 144 eran hermanas (29.5%) y sólo 13 eran madres de las mujeres con y sin CCU.

Se observó un promedio de edad mayor entre las familiares de primer grado de mujeres con CCU (37.1 ± 12) en relación a la observada en las familiares de mujeres sin CCU (32.5 ± 9.1) ($p < 0.001$). El nivel de escolaridad promedio fue mayor en familiares de mujeres con CCU con 9.6 años promedio de estudios (± 3.8), respecto a una media observada de 7.9 años (± 3.8), en el grupo de comparación (tabla 2.1). El porcentaje global de analfabetismo fue de 3.3%, predominando en el grupo de familiares de mujeres con CCU (5.6% vs. 1.5%). Más del 65% de la

población de estudio refirió dedicarse a las labores del hogar y solo el 21% tenía un empleo remunerado, favoreciendo a las familiares de mujeres sin CCU. Otras variables sociales en donde no se observaron diferencias entre los dos grupos de estudio fueron el índice de hacinamiento, el dinero semanal empleado en la compra de alimentos y los indicadores de hábito tabáquico.

En el grupo de variables reproductivas, se pudo observar diferencias estadísticamente significativas en la edad de la menarca (12.8 vs. 12.6), la edad de inicio de vida sexual (18.6 vs 19.7), el número de parejas sexuales (1.6 vs 1.5), el número de embarazos y partos (3.5 vs 2.4 / 2.6 vs 1.5), la edad del primer embarazo (19.7 vs 21.2), el tiempo de uso de anticonceptivos orales (13.8m vs 6.6m), el tiempo promedio de uso de condón (4.6m vs 6.3m), así como en la edad de la toma de la primera citología de detección de CCU (PAP) (28.8 vs 25.8).

Otras condiciones fueron similares entre ambos grupos como fue el número de cesáreas y abortos (0.54 vs 0.58 / 0.45 vs 0.34), el tiempo de uso de hormonales inyectables (4.5m vs 2.7m), el total de PAPs realizados (3.9 vs 3.7) y el número de familiares con antecedentes de CCU en familiares que no fueran de primer grado (0.5 vs 0.4). Las familiares de mujeres sin cáncer realizaron actividades de detección oportuna de CCU en promedio al menos una vez cada tres años a partir del inicio de vida sexual con mayor frecuencia que las familiares de mujeres con CCU (39.4% vs. 28.5%, $p=0.01$). Asimismo es importante señalar que una de

cada tres mujeres participantes se realizaron por primera vez el estudio de detección por invitación al estudio.

La prevalencia de infección por VPH en las familiares de mujeres con CCU fue de 18.1% (40/221) en relación a 16.5% (44/267) de la frecuencia observada en las familiares de mujeres sin CCU, no mostrando diferencias significativas (RP=1.09, I.C._{.95%}=0.7-1.6). Aún cuando la carga viral fue mayor entre las mujeres con antecedente familiar positivo a cáncer respecto a las mujeres sin éste antecedente, no se demostró significativamente diferente ($p=0.1$). De acuerdo a la distribución por grupos de edad, se observaron frecuencias mínimas de 8.3% en el grupo de 45 a 49 años y máxima de 30.8% en el grupo mayor de 50 años de edad en las familiares de mujeres sin CCU; la prevalencia menor observada en el grupo de familiares de mujeres con CCU fue de 14.3% en las mujeres con mas de 50 años y la cifra mayor fue de 23.8% en el grupo de 30 a 34 años, no se mostraron diferencias significativas por edad entre ambos grupos ($p=0.8$) (Gráfico 2.1).

Con esta información se pudo observar que importantes diferencias sociales, demográficas y reproductivas se encontraban entre las familiares de mujeres con CCU en relación a las familiares de mujeres sin CCU, desfavoreciendo al primer grupo o considerándolo en mayor riesgo de presentar una posible infección por VPH de alto riesgo, ya que las condicionantes se encontraban con mayor

frecuencia que en el grupo de familiares de mujeres sin CCU, lo cual no fue demostrado en este estudio.

11.2.1 ANÁLISIS DE FACTORES SOCIALES Y REPRODUCTIVOS EN LA INFECCIÓN POR VPH ALTO RIESGO.

La frecuencia global de infección a VPH alto riesgo en la población de familiares de mujeres con y sin CCU fue de 17.2% (84/488) con un intervalo de prevalencia entre 13.8% a 20.7%.

La distribución de la infección por grupos de edad se muestra en el gráfico 2.2 en el cual se observa que los grupos de edad extrema muestran las frecuencias mas altas de 19.8% para las menores de 35 años y de 33.3% en las mayores de 65 años de edad.

Las mujeres que refirieron estar casadas presentaron una menor frecuencia de infección por VPH en relación a otras condiciones del estado civil ($p=0.029$). Una baja escolaridad (primaria incompleta o analfabetismo) se relacionó con mayor frecuencia de infección (OR=6.5; 3.5-12-1) (Tabla 2.2).

El uso de los hormonales orales fue menor entre las pacientes positivas a la infección por VPH ($p=0.04$), contrario a lo observado en el uso de los hormonales inyectables donde el tiempo de uso fue mayor ($p =0.01$). El uso de dispositivo intrauterino mostró protección significativa para la infección por VPH entre las

usuarias (RP=0.7, I.C._{95%} = 0.4 – 0.9). Otras variables reproductivas, como la edad de la menarca, la edad de inicio de vida sexual, el número de embarazos, partos, abortos o cesáreas no mostraron significancia estadística para la infección por VPH, en ésta población.

El análisis de regresión logística, permitió obtener las variables con mayor peso específico en la asociación para infección por VPH de alto riesgo, independiente de ser familiar de mujer con y sin cáncer. La evaluación de malas condiciones de la vivienda, como un indicador del nivel social de ésta población, mostró una fuerte asociación con la presencia de infección por VPH (RP_a= 3.0, 1.3-6.9) al ajustar por otras variables sociales y reproductivas. La condición diferente al estado civil como casada referida por la paciente tuvo un exceso de riesgo significativo para la infección (RP_a = 1.8, 1.1-2.9). La edad de inicio de vida sexual temprano fue el único factor reproductivo asociado con la infección (RP_a >2.0) (Tabla 2.3)

El uso de anticonceptivos orales, independientemente del tiempo y de haber intercalado el uso con hormonales inyectables, mostraron una tendencia protectora respecto a la infección por VPH (RP_a=0.5, 0.2-1.0). De manera contraria el uso exclusivo y mayor a doce meses continuos de anticonceptivos inyectables mostró un efecto de mayores probabilidades de asociación con la infección por VPH (RP_a= 3.3, 1.3-8.4), a pesar del bajo tamaño muestral de mujeres que tenían esta condición.

11.2.2 HLA E INFECCIÓN POR VPH

En la muestra obtenida de familiares para la determinación genética de los alelos de HLA - A, B, DR y DQB1 (n=54), la frecuencia de infección por DNA-VPH alto riesgo fue de 20.3% (11/54), relativamente mayor a la frecuencia observada en el total de la población (17.2%). A excepción de las malas condiciones de la vivienda, el resto de variables sociales y reproductivas analizadas no se observó otro tipo de asociación significativa para la infección por VPH (tabla 2.2).

En las tablas 2.4 a 2.7 se puede apreciar las frecuencias génicas de los alelos de HLA-A,B,DR1 y DQB1 que se identificaron en las pacientes con CCU, en los controles (n=104 por grupo) y en sus respectivos familiares (n=27 por grupo). En todas las tablas se observa una menor variabilidad en los genes del grupo de familiares, pero con una distribución similar a la ya descrita en los casos y mujeres sin cáncer.

En la tabla 2.8 se muestran los haplotipos de HLA-A/B, A/DR, A/DQB1, B/DR y DR/DQB1 que se encontraron significativos para la asociación con CCU, así como los observados en sus familiares. En los casos el total de haplotipos identificados fue de 54 y 56 en los controles, sin embargo solo uno de ellos se observó en los familiares de casos y 13 en los familiares de controles. Ninguno mostró alguna diferencia significativa para la infección por VPH alto riesgo.

Respecto a las haplotipos de HLA-A/B/DR/DQB1 en las pacientes con CCU se observaron 17 haplotipos y 24 en controles. En las familiares de casos solo se observó uno (HLA-A24-B35-DR4-DQ*0302) y cuatro en los familiares de controles (3 HLA-A2-B39-DR4-DQ*0302 y 1 HLA A24-B35-DR4-DQ*0302) (tabla 2.9).

De acuerdo a los haplotipos identificados con asociación positiva o negativa con CCU, se busco si eran consistentes con la positividad a la infección por VPH alto riesgo en el grupo de familiares, ninguno de ellos mostró una relación significativa. En la exploración de otros haplotipos se observó que el haplotipo HLA-A24-B40-DR4-DQ*0302, el cual solo fue observado en tres casos de mujeres con CCU, mostro una asociación significativa con la infección por VPH alto riesgo ($p=0.01$) (Tabla 2.9).

12. DISCUSION.

PROBLEMA 1.

A la fecha, este es el primer estudio que busca medir asociación de los haplotipos de HLA clase I y HLA clase II relacionados con cáncer invasor de Cérvix e infección positiva específica con virus de papiloma humano tipo 16 de alto riesgo en población mexicana. Este es un punto de interés debido a que el CCU es una neoplasia inducida viralmente, en donde la respuesta inmune probablemente tiene un papel fundamental en el desarrollo y progresión de éste tipo de cáncer. La expresión de ciertos alelos de HLA clase II pueden estar asociados con presentación variable de antígenos virales a células T, que conduce a una eliminación con mayor o menor eficiencia de las células virales transformadas en etapas tempranas de la enfermedad (131).

Por otro lado, observamos que la región mayor de histocompatibilidad está involucrada en la regulación genética del número de células T- CD8 en humanos. En este estudio, los autores reportaron una frecuencia mayor de HLA-A1 en el grupo de sujetos con mayor número de células T- CD positivas (0.168 vs. 0.089; $p=0.003$) (132).

La identificación de una enfermedad genética primaria o secundaria es complicada por el fuerte ligamiento de desequilibrio que existe entre los genes del complejo de

HLA y por los factores ambientales tales como infección por VPH y CCU. Por ejemplo, algunos estudios han reportado asociación positiva con HLA B7 (133,134), el cuál esta en ligamiento de desequilibrio con HLA DRB1*1501-DQB1*0602, un haplotipo también identificado con riesgo aumentado para CCU (131). Las enfermedades malignas asociadas al complejo mayor de histocompatibilidad puede ser resultado de una combinación de algunas moléculas de HLA expresado en varios loci (clases I y/o II); por ello, decidimos estudiar los haplotipos de HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 y HLA-DQB1.

Se han reportado muchas asociaciones con HLA y CCU o lesiones precursoras (NIC), encontrando pocos resultados consistentes y obtenido muy variadas conclusiones. En este estudio, observamos que los alelos HLA-B39 y HLA-B18 estaban asociados positivamente con CCU-VPH16, pero no encontramos otras asociaciones positivas o negativas con HLA-A11 (135), HLA-A2 (135,136), HLA-B7 (133), o HLA-B15 (137). Solamente se ha confirmado la asociación con el alelo de HLA-DR15 y el CCU de acuerdo a lo reportado por otros autores (136,137), no así para el alelo HLA-DR13, el cuál ha sido reportado negativamente con el cáncer cervical (133,138). Algunos estudios han mostrado evidencia respecto a que ciertos alelos de HLA clase II o combinaciones de alelos pueden explicar mayor susceptibilidad en mujeres con CCU (93,131,139,140).

Nuestros resultados apoyan estudios previos en los que se reporta una asociación positiva con el haplotipo HLA-DR15/DQB1*0602 y cáncer de cérvix (86,131,141), pero ésta es inconsistente con otros reportes que han sugerido una asociación negativa (142). Los haplotipos HLA-B7/DQ*0302 (143), DR11/DQ*0301 (138), DR4/DQ*0301, y DR1/DQ*0301 (140) se han asociado con CCU en poblaciones latinoamericanas, senegalesas y mujeres americanas de raza blanca. En nuestro estudio no encontramos estas asociaciones con CCU.

De acuerdo a lo descrito hasta ahora, los haplotipos restantes descritos en este estudio no se han reportado previamente. Cuatro combinaciones con HLA-A y HLA-B estuvieron asociados con CCU, dos de ellos en forma negativa (HLA-A2/B39 y HLA-A24/B39) y dos en forma positiva (HLA-A2/B18 y HLA-A24/B15). Por otro lado, HLA-A1/DR13 y HLA-A2/DQB1*0301 fueron los haplotipos mas frecuentes encontrados en mujeres con CCU, mientras que HLA-B35/DR8 y HLA-B39/DQ*0301 los menos frecuentes. En este estudio se reportan 6 haplotipos completos HLA-A, HLA-B, HLA-DR y HLA-DQB1, tres de los cuáles mostraron asociación positiva con CCU y los tres restantes estuvieron asociados negativamente. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que algunos haplotipos de HLA clase I y II pueden estar involucrados con susceptibilidad para desarrollar CCU.

Por otro lado, la carga viral para ADN-VP16, así como algunas de sus variantes han demostrado estar asociado con la progresión del cáncer cervical (144 -146). En nuestro estudio encontramos diferencias significativas entre dos haplotipos de HLA (HLA-A1/DR13 y HLA-A24/B15) y mayor carga viral en los casos de CCU. Es importante enfatizar que en las mujeres sin cáncer no se presentaron estos haplotipos. Este hallazgo da sustento a la hipótesis relacionada con una posible susceptibilidad para evitar la respuesta inmune contra la infección por VP16.

Debemos considerar otros factores para explicar los resultados que fueron inconsistentes con los hallazgos publicados por otros autores. En relación a las variaciones poblacionales en la frecuencia génica (fg) de HLA, para HLA-B7, un alelo reportado en asociación con CCU, es mayor en mujeres de raza blanca (fg= 12.1782 comparada con mujeres latinas (fg=6.447), una frecuencia muy similar a la observada en las mujeres sin cáncer de éste estudio (fg=6.36) (147). Es importante señalar que los estudios que han reportado ésta asociación han incluido predominantemente mujeres blancas con NIC y no con cáncer invasor (133,134,140). Además, existen diferencias poblacionales a nivel mundial en la frecuencia de las variantes de VP16. En mujeres mexicanas con CCU, la variante VP16-AA es la de mayor frecuencia (45.7%) (117), lo cual no sucede en mujeres de raza blanca (14%) (148). En éste estudio no reportamos las variantes para VP16, pero es muy probablemente otro factor que esté relacionado con la variación en los resultados.

El grupo de mujeres seleccionadas como controles tiene fortalezas importantes como la de proceder de una misma población mestizo mexicana (tres generaciones previas nacidas en México), sin diferencias de edad, en condiciones similares socioambientales. La importancia de haber considerado su negatividad a la infección por VPH en el momento del estudio, era justamente la de controlar una posible variable confusora, debido principalmente a que la respuesta inmune a través de HLA es específica para cada uno de los más de 100 tipos de VPH. Por lo cual se eligió al VPH más frecuente identificado que corresponde al VPH16 ($\geq 50\%$) (149-151).

El no haber identificado en ese momento la infección a VPH, no significaba que no hubiera sido posible que se infectara a lo largo de su vida sexual, de acuerdo a cifras establecidas en estudios de prevalencia, se esperaría que alrededor del 60% de la población con inicio de vida sexual, en algún momento se hubiera expuesto, pero que fue capaz de eliminarla o no persistió (152).

Asimismo existe la posibilidad de que mujeres controles tuvieran presentes algún alelo de susceptibilidad a ciertos tipos oncogénicos potenciales de VPH, pero que ante la falta de estímulo antigénico, pues no hay lesiones asociadas que se transformen en oncogénicas. Sin embargo no se debe dejar de lado que de acuerdo a los resultados observados sería una bajísima probabilidad de encontrar un sujeto con este tipo de alelos.

Una pregunta de interés y que nos ha hecho reflexionar al respecto es ¿Cuál sería el mejor control para un estudio en la búsqueda de marcadores genéticos de susceptibilidad para la presencia de una enfermedad como es el cáncer cervical? Considero que serían mujeres sin cáncer que hubiera tenido antecedente de infección por VPH16 y que hubiera sido capaz de negativizarla.

Los resultados obtenidos del análisis de HLA fue realizado con un 89% del tamaño de muestra calculado para el estudio de casos y controles, lo cual conduce a mayores posibilidades de un error tipo II, sin embargo aún así fue posible encontrar diferencias de gran interés entre los grupos. Es importante notar que algunas combinaciones o haplotipos estuvieron presentes solo en casos o en controles, lo que hace difícil probar hipótesis estadísticamente. Consideramos que el haber tenido un buen grupo de comparación contribuyó a identificar estas diferencias.

Los sesgos de mala clasificación por la exposición no se presentaron en este tipo de estudio, ya que al ser un estudio genético, implica una condición de nacimiento de carácter heredable y que no se modifica a lo largo del tiempo. Por otro lado con el fin de evitar los sesgos de mala clasificación de la enfermedad, se considero la validez de los casos con CCU de acuerdo al resultado del diagnóstico histopatológico, el cual se considera el estándar de oro para un diagnóstico definitivo. Con el fin de descartar la presencia de CCU en los controles, se

consideraron tres condiciones, una clínica, descartando la presencia de signos o síntomas cervicovaginales, estudio de citología cervical normal o clase II inflamatoria, estudio colposcópico negativo a lesiones intraepiteliales y ser negativos a VPH AR.

El presente estudio tiene la ventaja de una selección cuidadosa y representativa de mujeres con CCU y de un grupo de controles pertenecientes a la misma base poblacional, minimizando por lo tanto la posibilidad de sesgos de selección relacionados con la atención médica y el ambiente de lugar de procedencia. Por otro lado, debemos considerar que el tamaño de muestra elegido no es grande y que existe la posibilidad de que asociaciones débiles pudieron no haber sido identificados.

Los resultados encontrados nos muestran que el análisis de los haplotipos de HLA clase I y II, y no solo el estudio de un alelo es importante para identificar algunas asociaciones con la enfermedad. Aunque la combinación de alelos disminuye las frecuencias observadas en los individuos, hubo la posibilidad de observar que combinaciones complejas estén probablemente involucradas en la susceptibilidad para evadir, la respuesta inmune a VPH 16 y por lo tanto aumentan las posibilidades de presentar CCU invasor.

12.2 DISCUSION PROBLEMA 2

En esta segunda fase del proyecto se realizó un estudio comparativo transversal analítico. Se analizaron las posibles diferencias de los factores de riesgo de tipo social y reproductivo identificados para el cáncer invasor de cérvix entre familiares de primer grado de mujeres con y sin CCU. Asimismo se identificó la prevalencia de infección por VPH en búsqueda de la asociación de los haplotipos de HLA-A/B/DR/DQB1 identificados como de riesgo en sus familiares con y sin cáncer.

Los resultados no mostraron diferencia entre el antecedente familiar de CCU y el presentar infección por VPH-AR, a pesar de que la población con antecedente de CCU presentaban los factores de riesgo reconocidos tanto para la infección por VPH como para el desarrollo de CCU. De acuerdo a los antecedentes sobre el riesgo familiar de CCU, se ha observado que puede existir un riesgo de entre 1.8 a 2.5 veces mas probabilidades de que al detectar un caso, la hija o la madre puedan también presentar un cáncer invasor (98,100). Por otro lado, el hecho de haber identificado al virus de papiloma humano como un agente etiológico en la patogenia del CCU, que se considera como una causa necesaria pero no suficiente para su desarrollo, nos permitía generar la hipótesis de que las familiares del grupo de mujeres con cáncer invasor tuvieran mayores probabilidades de presentar infección viral, aunque no necesariamente de cáncer.

La prevalencia de infección por VPH de alto riesgo observada en los grupos de estudio fue de 18.1% en familiares de mujeres con CCU y de 16.5% en familiares

sin éste antecedente ($p=0.6$). Ambas frecuencias se encuentran dentro de los valores esperados para el promedio de edad de las mujeres participantes, entre 8 a 20%, y que en promedio presentaron seis años menos de edad que los casos de lesiones precursoras (NIC) y diez años menos que la edad presentada entre los casos con CCU invasor (14,15,154). Al comparar la media de edad en mujeres con infección por VPH en este estudio, con las que informan otros autores, se observa que en México, al igual que en otros países, es más frecuente entre las mujeres jóvenes (42,155,156). Un segundo pico fue observado en mujeres mayores de 50 años de edad (30.8%). Este hecho ha sido explicado por un mecanismo relacionado probablemente a un efecto generalizado de la edad sobre la disminución en la respuesta inmune (157).

Las mujeres que eran familiares directas de las pacientes con CCU presentaron mayores factores de riesgo conocidos para la presencia de la enfermedad, lo que hizo pensar que se podría encontrar, asimismo, mayor frecuencia de la infección por VPH. Sin embargo esto no pudo ser demostrado, posiblemente por un sesgo de selección, ya que nuestros criterios incluían, tener un cérvix íntegro (para la toma adecuada de muestra), sin antecedentes de lesiones intraepiteliales del cérvix, ni otra neoplasia. Por lo que es posible que estuviéramos eligiendo mujeres con menor riesgo de presentar infección por VPH y desarrollo de cáncer cervical.

Los factores asociados a la infección por VPH, independientemente de tener o no un familiar con CCU, estuvieron relacionados tanto con indicadores de nivel social, como algunos reproductivos, tal como se han descrito en otros estudios (158,159). La falta de servicios públicos como son drenaje y agua potable intradomiciliaria fueron características en la evaluación de malas condiciones de la vivienda, que fue una de las variables fuertemente asociada a la presencia de infección por VPH.

Por otro lado el inicio temprano de vida sexual se ha relacionado con mayores probabilidades de infección por VPH, debido principalmente a la zona de transformación, la cuál es más proliferativa durante la pubertad y la adolescencia, lo hace especialmente susceptible a alteraciones que pueden ser inducidas por agentes transmitidos sexualmente, entre ellos el VPH. Lo anterior es congruente con la idea de que las infecciones por VPH durante la adolescencia tienen una probabilidad más alta de convertirse en infecciones crónicas. Es posible reducir el riesgo al postergar el inicio de las relaciones sexuales (154).

El uso de anticonceptivos orales ha sido estudiado en los trabajos que exploran factores de riesgo para la infección por VPH, los estudios que han encontrado una asociación positiva están relacionados con un tiempo de exposición mayor a 5 años de uso (160,161), sin embargo en nuestra población solo 4.3% (21/488) de las mujeres presentaron ésta condición, ninguna de ellas fue positiva a la infección

por VPH, razón por la cuál en nuestros resultados se muestra una asociación negativa con la infección por VPH. Semejante a otros reportes, no se encontró asociación con ningún indicador de tabaquismo (158,159,162), aunque no descartamos la posibilidad de otros factores incluyendo los genéticos, que puedan estar confundiendo la relación tabaquismo e infección por VPH (29-32).

12.2.2 HLA E INFECCIÓN POR VPH.

En la muestra obtenida de familiares para la determinación genética de los alelos de HLA - A, B, DR y DQB1 (n=54), la frecuencia de infección por DNA-VPH alto riesgo fue de 20.3% (11/54), valor que se encuentra dentro del límite superior de la muestra donde fue obtenido y de acuerdo a los valores esperados en población general (154). De los haplotipos HLA A/B, A/DR, A/DQB1, B/DR o DR/DQB1 que se asociaron de manera positiva o negativa en las mujeres con CCU, solo tres pudieron ser explorados en las familiares. En el caso de HLA A2-B39, un haplotipo identificado como protector entre pacientes con y sin cáncer, se identificaron cinco mujeres con el haplotipo, las cuales fueron negativas a la infección y eran familiares de controles. De manera similar el haplotipo HLA B35-DR8, con efecto protector, de los 8 casos encontrados eran familiares de controles, de los cuales seis (75%) eran negativos a la infección por VPH alto riesgo. El haplotipo HLA A2-B18 identificado como de riesgo para CCU, solo fue identificado en una paciente, familiar de caso y positiva a VPH.

En relación a los haplotipos completos HLA A-B-DR-DQB1, solo dos con efecto protector pudieron ser analizados (HLA A2-B39-DR4-DQ*0302 y HLA A24-B35-DR4-DQ0302) cinco casos que resultaron negativos a la infección, cuatro de las cuales eran familiares de controles y solo una era familiar de una paciente con CCU. Un haplotipo que resultó no ser significativo en la comparación de las mujeres con CCU y controles sin la enfermedad, pero que solo estuvo presente en los casos (n=3), se encontró en tres mujeres familiares de casos y en una familiar de controles, tres de las cuales resultaron positivas a infección por VPH alto riesgo (p=0.01).

Un sesgo de selección observado con los familiares de casos y controles, se debió a los criterios de inclusión utilizados en el proyecto (no haber presentado lesiones intraepiteliales del cérvix, citología cervical sin alteraciones, cérvix íntegro, edad no controlada, haber iniciado vida sexual, no estar embarazada y sin padecimientos inmunológicos o tratamientos con inmunodepresores). Estas características condujeron a una selección de mujeres con bajo riesgo de infección y/o de presentar lesiones precursoras de CCU, por lo tanto con menos probabilidades de presentar algunos de los alelos y/o haplotipos de HLA encontrados en los casos de CCU.

Los resultados previos solo pudieron ser comparados con los obtenidos en este mismo trabajo, ya que la asociación de éstos haplotipos con CCU no han sido

reportados en otros trabajos. Por otro lado el tamaño de muestra imposibilita demostrar otras posibles asociaciones con la infección por VPH alto riesgo, sin olvidar por supuesto que debido a que solo se realizó una medición transversal, no pudieron ser identificadas aquellas mujeres con infección persistente, que son quienes tienen mayores probabilidades de desarrollar lesiones precursoras de cáncer invasor de cérvix (105,116).

El presente trabajo consistente con los resultados previos, apoya la hipótesis de que los haplotipos de HLA, pueden estar asociados a una evasión inmunológica de la infección por virus de papiloma humano de alto riesgo y por conducente a mayor probabilidad de presentar lesiones intraepiteliales del cérvix uterino que potencialmente pueden progresar a cáncer de cérvix.

13. CONCLUSIONES.

- En presencia de infección por VPH16 en pacientes con cáncer invasor del cérvix uterino, los haplotipos de HLA clase I y II, DRB1*15/DQB1*0602, HLA-A2-B44-DR4-DQ*0302, HLA-A24-B35-DR16-DQ*0301, y HLA-A2-B40-DR4-DQ*0302 están asociados positivamente con ésta neoplasia maligna.
- Los haplotipos de HLA clase I y II, HLA A2/B39, HLA-A24/B39, HLA-B35/DR8, HLA-A2-B39-DR4-DQB1*0302 (OR=0.16, IC95%=0.04-0.06), HLA-A24-B35-DR4-DQB1*0302 (OR=0.05, IC95%=0-003-0-39) y HLA-A68-B40-DR4-DQB1*0302 (OR=0.06, IC95%=0-003-0-45) estuvieron asociados negativamente con CCU e infección por VPH16.
- La frecuencia de infección por DNA-VPH alto riesgo en pacientes con CCU fue de 97.9% (279/285), en mujeres control, en las familiares de casos y en familiares de controles fue de 9% (25/277), 18.1% (40/221) y de 16.5% (44/267) respectivamente.
- Se mostraron diferencias esperadas en los factores de riesgo sociales y reproductivos entre casos y controles en la asociación con CCU positivas a la infección por VPH 16.
- Los alelos de HLA clase I y clase II mostraron estar en desequilibrio de ligamiento y en equilibrio de Hardy-Weinberg en la población de casos y controles.

- Algunos haplotipos de HLA clase I (A,B) y clase II (DR, DQB1) mostraron diferencias en la asociación entre pacientes con CCU positivas a infección por VPH16 y controles sin cáncer.
- Un mayor número de haplotipos únicos fue observado en las pacientes con cáncer, comparativamente con lo observado en los controles.
- La carga viral por DNA-VPH 16 fue diferencial para dos haplotipos HLA clase I y clase II (HLA A1-DR13, HLA A24-B15), en mujeres con CCU.
- En las familiares de primer grado de mujeres con y sin CCU, no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de infección por VPH en mujeres con antecedente de CaCu respecto a las que no lo tenían.
- Las familiares de casos y de controles compartían factores de riesgo sociales y reproductivos semejantes a sus familiares de origen.
- Los factores de riesgo para la presencia de infección por VPH fueron similares a los reportados en la literatura entre familiares de casos y controles.

14. APOYOS RECIBIDOS PARA LA REALIZACIÓN DE LA TESIS.

- 1). Fondo de apoyo a investigación. Instituto Nacional de Cancerología.
- 2). Fondo de investigación en salud. Instituto Mexicano del Seguro Social.
- 3). Aportaciones por la industria farmacéutica.
- 4). Captura de Híbridos.

FOFOI-IMSS SI-2001/261/279, FP 2003/137. 2004/039 to DMHH

15. PRODUCTOS GENERADOS POR LA TESIS:

- 1) Graduación de un alumno de maestría.

Teresa Juárez Cedillo. Asociación de riesgo genético de cáncer cervicouterino con infección de virus del papiloma humano. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, UNAM. Grado de Maestra en Ciencias. Facultad de Medicina, UNAM, 24 de noviembre 2003.

- 2) Publicación de cuatro artículos.

Hernández-Hernández Dulce M; Cerda-Flores Ricardo M; Juárez-Cedillo Teresa; Granados-Arriola Julio; Vargas-Alarcón Gilberto; Apresa-García Teresa; Alvarado-Cabrero Isabel; García-Carrancá Alejandro; Salcedo-Vargas Mauricio; Mohar-Betancourt Alejandro. Human leukocyte antigens I and II haplotypes associated with human papillomavirus 16-positive invasive cervical cancer in Mexican women. Int J Gynecol Cancer 2009;19(6):1099-106.

Hernández-Hernández DM, Linaldi-Yépez F, Apresa-García T, Escudero de los Ríos P, Alvarado- Cabrero I, Ornelas-Bernal L, Mohar-Betancourt A. Factores Asociados a Incumplimiento para tamizaje en Cáncer de Cérvix. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2007;45(4):313-320

Cedillo-Juárez T, Vallejo M, Fragoso JM, Hernández-Hernández DM, Rodríguez PJM, Sánchez GS, García PMC, García CA, Mohar BA, Granados J, Vargas-Alarcón G. The risk of developing cervical cancer in Mexican women is associated to CYP1A1 MspI polymorphism. Eur J Cancer 2007;43:1590-1595

Piña P, Hernández-Hernández DM, Lizano M, Salcedo M. HPV Specific viral types are common in Mexican women affected by cervical lesions. Int J Gynecol Cancer 2006; 16:1041-1047.

16. REFERENCIAS.

1. Wilson CM, Tobin S, Young RC. The exploding worldwide cancer burden: the impact of cancer on women. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14:1-11.
2. American Cancer Society. Statistics for 2008. *Global Cancer Fact & Figures* 2007.
3. Brookfield KF, Cheng MC, Lucci J, Fleming LE, Koniaris LG. Disparities in survival among women with invasive cervical cancer. A problem of access to care. *Cancer* 2009;115:166-78.
4. Quinn MA, Benedet JL, Odicino F, et al. Carcinoma of the cervix Uteri. 26th Annual Report on the results of treatment in gynecological cancer. *Int Gynecol Obst* 2006; 95 (Suppl 1): S43-S103.
5. Organización Mundial de la Salud (OMS), Globocan 2002. UED Agencia internacional para la investigación contra el cáncer. Disponible en: <http://www-dep.iarc.fr/dataava/infodata.htm>. Consultado: febrero 7, 2009.
6. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer, datos nacionales. México: Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI):Feb 2008;1-3.
7. Ferenczy A: Cervical intraepithelial neoplasia. In: Blauustein A. Ed. *Pathology of female genital tract*, New York, Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag,1977:156-177.
8. Buckley CH, Butler EB, Fox H, Cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol* 1982;35:1-13.
9. National Cancer Institute Workshop. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. *JAMA* 1989; 262:931-4.
10. Solomon F, Davey D, Kurman R. The Bethesda system 2001: terminology for reporting the results of cervical cytology. *J Am Med Assoc* 2002;287:2115-9.

11. Kurman RJ, Henson DE, Herbst DL, Noller KL, Schiffman MH. Interim guidelines for management of abnormal cervical cytology. The 1992 National Cancer Institute Workshop. *JAMA* 1994;271:1866-1869.
12. Moscicki AB, Shiboski S, Hills NK, Powell KJ, Jay N, Hanson EN, Miller S, Canjura-Clayton KL, Earhat S, Broering JM, Darragh TM. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet* 2004; 364:1678-1683.
13. Moore K, Cofer A, Elliot L, Lanneau G, Walker J, Gold MA. Adolescent cervical dysplasia: histologic, evaluation, treatment, and outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197:141.e1-141.e6.
14. Melnikow J, Nuovo J, Willan AR, Chan BK, Howell LP. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1998; 92:727-35.
15. Wheeler CM. Natural history of human papillomavirus infections, cytologic and histologic abnormalities, and cancer. *Obstet Gynecol Clin N Am* 2008;35:519-536.
16. Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:3-13.
17. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 2006;24S3:42-51.
18. Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clinical Virology* 2000;19:1-5.
19. zur Hausen H. Viruses in Human Cancers. *European J Cancer*. 1999;35:1174-1181.
20. Mantovani F, Banks L. The interaction between p53 and papillomaviruses. *Seminars in Cancer Biology* 1999;9:387-395.
21. Brinton LA, Hamman RF, Huggins GR, et al. Sexual and Reproductive Risk Factors for Invasive Squamous Cell Cervical Cancer. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79:23-30.
22. Bosch FX, Muñoz N, De Sanjose S, et al. Risk factors for cervical cancer in Columbia and Spain. *Int J Cancer* 1992;52:750-758.

23. Hernández-Hernández DM, Hernández-Alemán F, Ornelas-Bernal L, González-Lira G, Andrade A, Martínez-García MC. Cáncer de cuello uterino. Factores Sociales, clínicos y reproductivos asociados con lesiones precursoras. *Rev Med IMSS* 2001;39:325-333.
24. Rajkumar T, Cuzick J, Appleby P, Barnabas R, Beral V, Berrington De González A, Bull D, Meirik O. Cervical carcinoma and reproductive factors: Collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2006;119:1108-1124.
25. Fischer N. Chlamydia trachomatis infection in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 2002, 23:247-250.
26. Paba P, Bonifacio D, Di Bonito L, Ombres D, Favalli C, Syrjänen K, Ciotti M. Co-expression of HSV2 and Chlamydia trachomatis in HPV-positive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia lesions is associated with aberrations in key intracellular pathways. *Intervirology* 2008;51:230-234.
27. Singh DK, Anastos K, Hoover DR, Burk RD, Shi Q, Ngendahayo L, Mutimura E, Castle PE. Human papillomavirus infection and cervical cytology in HIV-infected and HIV-Uninfected Rwandan women. *J Infect Dis* 2009;199:1851-1861.
28. International collaboration of epidemiological studies of cervical cancer. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16573 women with cervical cancer and 35 509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet* 2007;370:1609-1621.
29. Bicho MC, Pereira da Silva A, Matos A, Medeiros SR, Diamantino BM. Sex steroid hormones influence the risk for cervical cancer: modulation by haptoglobin genetic polymorphism. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2009;191:85-89.

30. Helberg D, Stendahl U. The biological role of smoking, oral contraceptive use and endogenous sexual steroid hormones in invasive squamous epithelial cervical cancer. *Anticancer research* 2005;25:3141-3146.
31. Cedillo-Juárez T, Vallejo M, Fragoso JM, Hernández-Hernández DM, Rodríguez-Pérez JM, Sánchez-García JM, García-Peña MC, García-Carranca A, Mohar-Betancourt A, Granados J, Vargas-Alarcón G. The risk of developing cervical cancer in Mexican women is associated to CYP1A1 MspI polymorphism. *Eur J Cancer* 2007;43:1590-1595.
32. Hecht S. S. DNA adduct formation from tobacco-specific *N*-nitrosamines. *Mutat Res* 1999;424:127-142.
33. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, Markowitz LE. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA* 2007;297:813-819.
34. Hibbits S, Jones J, Powel N, Dallimore N, McRea J, Beer H, Tristram A, Fielder H, Fiander AN. Human papillomavirus prevalence in women attending routine cervical screening in South Wales, UK: A cross-sectional study. *B J Cancer* 2008;99:1929-1933.
35. Peyton CI, Gravitt PE, Hunt WC, Hundley RS, Zhao M, Apple RJ, Wheeler CM. Determinants of genital human papillomavirus detection in a US population. *J Infect Dis* 2001;183:1554-1564.
36. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJF, Peto J, Meijer CJLM, Muñoz N. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-9.
37. Ralston-Howe E, Li Z, McGlennen RC, Hellerstedt WL, Downs Jr, LS. Type-specific prevalence and persistence of human papillomavirus in women in the United States who are referred for typing as a component of cervical cancer screening. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200:245.e1-e7.

38. Winer RL, Harris TG, Xi LF, Jansen KU, Hughes JP, Feng Q, Wlwbob C, Koutsky LA. Quantitative human papillomavirus 16 and 18 levels in incident infections and cervical lesion development. *J of Medica Virology* 2009;81:713-721.
39. Hernández HDM, Ornelas-Bernal L, Guido-Jiménez MC, Apresa-García T, Alvarado-Cabrero I, Salcedo-Vargas M, Mohar-Betancourt A, García-Carrancá A. Association between High-risk Human Papillomavirus DNA load and Precursor Lesions of Cervical Cancer in Mexican Women. *Ginecol Oncol* 2003; 90:310-317.
40. IARC. Human Papillomaviruses. IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risks to humans. 1995; 64:21-45.
41. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuch B, Zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus type 18 and 16 sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985;314:111-114.
42. Bosch FX, Manos M, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kuman R. Shah K. EBSCC Study Group: Prevalence of Human Papillomavirus in Cervical Cancer: a Worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796-802.
43. Butsch KM, Castle PE, Herrero R, Schiffman M, Sherman ME, Wacholder S, Rodríguez AC, Hutchinson ML, Bratti MC, Hildesheim A, Morales J, Alfaro M, Burk RD. Relationships of human papillomavirus type, cualitative viral load and age with cytologic abnormality. *Cancer Res* 2006;66:10112-10119.
44. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27.
45. Muñoz N, Bosch FX, Castellsague X, Díaz M, DeSanJose S, Hammouda D, Shah KV. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* 2004;111:278-285.

46. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 1997; 71:2463-72.
47. Xi LF, Kiviat NB, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, Ho J, Loutsky LA. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1045-1052.
48. Piña P, Hernández-Hernández DM, Lizano M, Salcedo M. HPV Specific viral types are common in Mexican women affected by cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16:1041-1047.
49. Chan SY, Ong CH, Chow V, Drescher B, Durst M, Meulen J, Villa L, Luande J, Mgaya HN, Bernard H-U. Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol* 1992;66:2057-2066.
50. Ong CK, Chan SY, Campo MS, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, Pfister H, Tay SK, Meulen J, Villa LL, Bernard H-U. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol* 1993;67:6424-6431.
51. Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM, et al. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(11):796– 802.
52. Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res* 1998;58(4):829– 33.
53. Lizano-Soberon M, De la Cruz-Hernandez, Carrillo-García A, Ponce de Leon-Rosales Sergio, Alejandro García-Carrancá, Dueñas-Gonzalez Alfonso, Hernandez-Hernandez

- D, Mohar A. Distribution of HPV-16 and -18 intratypic variants in normal cytology, *Gynecol Oncol* 2006; 102:230-5.
54. Tang CK, Shermeta DW, Wood C. Congenital Condyloma Acuminata. *Am J Obstet Gynecol* 1978;131:912-913.
55. Castellsagué X, Drudis T, Cañadas MP, Goncé A, Ros R, Pérez JM, Quintana MJ, Bosch FX. Human papillomavirus (HPV) infection in pregnant women and mother-to-child transmission of genital HPV genotypes: A prospective study in Spain. *BMC Infectious diseases* 2009;9:74.
56. Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. Transplacental transmission of Human Papillomavirus. *Virology* 2008;5:106.
57. Winer RL, Koutsky LA. Delivering Reassurance to Parents: perinatal human papillomavirus transmission is rare. *Sex Transm Dis* 2004;31:63–64.
58. Canadas MP, Bosch FX, Junquera ML, et al. Concordance of prevalence of human papillomavirus DNA in anogenital and oral infections in a high-risk population. *J Clin Microbiol* 2004;42:1330–1332.
59. Sonnex C, Strauss S, Gray JJ. Detection of human papillomavirus DNA on the fingers of patients with genital warts. *Sex Transm Infect* 1999; 75:317-319.
60. Marais DJ, Sampson CC, Urban MI, Sitas F, Williamson AL. The seroprevalence of IgG antibodies to human papillomavirus (HPV) types HPV-16, HPV-18, and HPV-11 capsid-antigens in mothers and their children. *J of Medical Virology* 2007;79:1370-1374.
61. Stewart CA, Horton R, Allcock RJN, Ashurst JL, Atrazhev AM, Coggill P, Dunham I, Forbes S, Halls K, Howson JMM, Humphray SJ, Hunt s, Mugall AJ, Osoegawa K, Palmer S, Roberts AN, rogers J, Sims S. Wang Y, Wilming LG, Elliot JF, de Jong PJ, Sawcer S, Todd JA, Trowsdale J, Beck S. Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping. *Genome Res* 2004; 14:1176-1187.

62. Pan-Yun TJ, Trowsdale J. Genetic control of MHC class II expression. *Cell* 2002;109:s21-s33.
63. Trowsdale, J., Powis, S.H. (1992). The MHC region-relationship between linkage and function. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2, 492-497.
64. Buentello-Malo L, Peñaloza-Espinosa RI, Salamanca-Gómez F, Cerda-Flores RM. Genetic admixture of eight Mexican indigenous populations: based on five polymarker, HLA-DQA1, and RH loci. *Am J Hum Biol* 2008;20:647-650.
65. Kochi Y, Suzuki A, Yamada R, Yamamoto K. Genetics of rheumatoid arthritis: underlying evidence of ethnic differences. *J Autoimmun* 2009;32:158-62.
66. Rodríguez-Ventura AL, Yamamoto-Furusho JK, Coyote N, Dorante LM, Ruiz-Morales JA, Vargas-Alarcón G, Granados J. HLA-DRB1*08 allele may help to distinguish between type 1 diabetes mellitus and type 2 diabetes mellitus in Mexican children. *Pediatr Diabetes* 2007;8:5-10.
67. Gorodezky C, Terán L, Escobar-Gutiérrez A. HLA frequencies in a Mexican Mestizo Population. *Tissue Antigens* 1979;14:347-352.
68. Lisker R, Ramírez E, Pérez Briceño R, Granados J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture estimates in four mexican urban centers. *Human Biol* 1990;62:791-801.
69. Weckman AL, Vargas-Alarcón G, López M, González N, De Leo C, Castelán N, Bordes J, Alarcón-Segovia D, Granados J, Ramírez E, Lisker R. Frequencies of HLA-A and HLA-B alleles in a Mexico city mestizo sample. *Am J Hum Biol* 1997;9:1-5.
70. Cerda-Flores RM, Villalobos-Torres MC, Barrera-Saldaña HA, Cortés-Prieto LM, Barajas LO, Rivas F, Carracedo A, Zhong Y, Barton SA, Chakraborty R. Genetic admixture in three Mexican Mestizo populations based on D1S80 and HLA-DZA1 loci. *Am J Hum Biol* 2002;14:257-263.
71. Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruíz-Cabello F, Stern LP. Natural History of HLA expression during tumour development. *Immunology Today* 1993;14:491-499.

72. Sato N, Hirohashi Y, tsukahara T, Kikuchi t, Sahara H, Kamiguchi K, Ichimiya S, Tamura Y, Torigoe T. Molecular pathological approaches to human tumor immunology. *Pathol Int* 2009;59:205-17.
73. García-Vallve S, Alonso A, Bravo IG. Papillomaviruses: different genes have different histories. *Trends in Microbiology* 2005;13:514-521.
74. Frazer IH. Immunology of papillomavirus infection. *Curr Opin Immunol* 1996;8:484-491.
75. Herrington CS. Human papillomaviruses and cervical neoplasia. II Interaction of VPH with other factors. *J Clin Pathol* 1995;48:1-6.
76. Man Stephan. Human cellular immune responses against human papillomaviruses in cervical neoplasia. *Molecular Medicine* 1998;1-19.
77. Engelhard VH. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annual Review of Immunology* 1994;12:181-184.
78. Cromme FV, van Bommel PF, Walboomers JM, Galilee MP, Stern PL, Kenemans P, Helmerhorst TJ, Stukart MJ, Meijer CJ. Differences in MHC and TAP-1 expression in cervical cancer lymph node metastases as compared with the primary tumours. *Br J cancer* 1994b;69:1176-81.
79. Hohn H, Reichert T, Neukirck C, Pilch H, Maeurer MJ. Monoclonal TCR mRNA transcripts are preferentially detected in the TCR variable alpha chain in DC8(+) T-lymphocytes: implications for immunomonitoring. *Int J Mol Med* 1999;3:139-144.
80. Stern PL. Immunity to human papillomavirus-associated cervical neoplasia. *Adv Cancer Res* 1996;69:175-211.
81. Luxton J, Shepherd P. Human papillomavirus antigens and T-cell recognition. *Curr Opin Infect Dis* 2001;14:139-43.
82. O'Brien PM, Tsirimonaki E, Coomber DW, Millan DW, Davis JA, Campo MS. Immunoglobulin genes expressed by B-lymphocytes infiltrating cervical carcinomas

- show evidence of antigen-driven selection. *Cancer Immunol Immunother*, 2001;50:523-532.
83. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen, Stern PL. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumors. *Immunol Today* 1997;18:89-95.
84. Odunsi K, Terry G, Ho L, Bell J, Cuzick J, Ganesan TS. Association between HLA DQB1*03 and cervical intraepithelial neoplasia. *Mol Med* 1995;1:161-171.
85. Gregorie L, Lawrence WD, Kukuruga D, Eisenbrey AB, Lancaster WD. Association between HLA-DQB1 Alleles and risk for cervical cancer in African-American women. *Int J Cancer* 1994;57:504-507.
86. Engelmark M, Beskow A, Magnusson J, Erlich H, Gyllensten U. Affected sib-pair analysis of the contribution of HLA class I and class II loci to development of cervical cancer. *Human Molecular Genetics* 2004;13:1951-1958.
87. Farjadian S, Naruse T, Kawata H, Ghaderi A, Bahram S, Inoko H. Molecular analysis of HLA allele frequencies and haplotypes in Baloch of Iran compared with related populations of Pakistan. *Tissue Antigens* 2004;64:581–587.
88. Chil A, Silorski M, Bobek M, Jakiel G, Marcinkiewicz J. Alterations in the expression of selected MHC antigens in premalignant lesions and squamous carcinomas of the uterine cervix. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003; 82:1146.52.
89. Gruener M, Bravo IG, Momburg F, Alonso A, Tomakidi P. The E5 protein of the human papillomavirus type 16 down-regulates HLA-1 surface expression in calnexin-expressing but not in calnexin-deficient cells. *Virology* 2007;30:116.
90. Syrjänen K, Nurmi T, Mäntyjarvi R, Ilonens J, Syrjänen S, Surcel HM, Yliskiski M, Väyrynen M, Chang F, Saarikiski S. HLA types in women with cervical human papillomavirus (HPV) lesions prospectively followed up for 10 years. *Cytopathology* 1996;7:99-107.

91. Silva B, Vargas AG, Zuñiga RJ, Rodríguez RTS, Hernández MB, Osnaya N, Hojiman S, Torres LA; Granados J. Genetic Features of Mexican women predisposing to cancer of the uterine cervix. *Human pathology* 99;30: 626-628.
92. Wang SS, Hildesheim A, Gao X, Schiffman M, Herrero R, Bratti MC, Sherman EM, Barnes WA, Greenberg MD, McGowan L, et al. Comprehensive analysis of Human Leukocyte antigen class I alleles and Cervical Neoplasia in 3 epidemiologic studies. *J infectious Dis* 2002;186:598-605.
93. Odunsi K, Terry G, Ho Linda, Bell J, Cuzick J, Ganesan TS. Susceptibility to human papillomavirus-associated cervical intra-epithelial neoplasia is determined by specific HLA DR-DQ alleles. *Int J Cancer* 1996;67:595-602.
94. Nawa A, Nishiyama Y, Kobayashit, et al. Association of Human Leukocyte antigen-Biko3 with cervical cancer in Japanese women aged 35 year and younger. *Cancer* 1995;75:518-21.
95. Helland A, Borresen AL, Kristensen G, Ronningen KS. DQA1 and DQB1 genes in patients with squamous cell carcinoma of the cervix: relationship to human papillomavirus infection and prognosis. *Cancer Epidemiol Bio Prev* 1994;3:479-486.
96. Ferrera A, Olivo A, Alaez C, Melchers WJG, Gorodezky C. HLA DQ A1 and DQB1 Loci in Honduran Women with Cervical Dysplasia and Invasive Cervical Carcinoma and Their relationship to Human Papillomavirus Infection. *Human Biology* 99;71:367-379.
97. Magnusson PE, Sparén Pär, Gyllesten UB. Genetic link to cervical tumours. *Nature* 1999;400:29-30.
98. Hemminki K, Dong Ch, Vaittinen P. Familial risks in cervical cancer: is there a hereditary component? *Int J Cancer* 1999;82:775-781.
99. Couto E, Hemmink K. Heritable and environmental components in cervical tumors. *Int J Epidemiol* 2006; 119:2699-2701.

100. Hemminki K, Bowang Ch. Familial risks for cervical tumors in full and half siblings: etiologic apportioning. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:1413-1414.
101. Chan SY, Bernard H-U, Ong CK, Chan SP, Hormann B, Delius H. Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a showcase for the molecular evolution of DNA viruses. *J Virol* 1992;66:5714-5725.
102. Muñoz N, Bosch FX, De Sanjose S, et al. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population based case-control study in Columbia and Spain. *Int J Cancer* 1992;52:743-749.
103. Bosch FX, Manos M, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kuman R, Shah K. EBSCC Study Group: Prevalence of Human Papillomavirus in Cervical Cancer: a Worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796-802.
104. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005; 32S:S16-S24.
105. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyaura RA, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL. Persistent Human Papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 2001; 286:3106-3114.
106. Castellsague X, Munoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis—role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;:20-28.
107. Arias-Pulido, Joste N, Wheeler CM. Loss of heterozygosity on chromosome 6 in HPV-16 positive cervical carcinomas carrying the DRB1*1501.DQB1*0602 haplotype. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;40:277-284.
108. Birkeland SA, et al. Cancer risk after renal transplantation in the Nordic Countries, 1964-1986. *Int J Cancer* 1995;60:183-189.

109. Courtney AE, Leonard N, O'Neill CJ, McNamee PT, Maxwell AP. The uptake of cervical cancer screening by renal transplant recipients. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2009; 24:647-652.
110. Ho GYF, Burk RD, et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1365-1371.
111. García-Piñeres AJ, Hildesheim A, Herrero R, Trivett M, Williams M, Atmetlla I, Ramírez M, Villegas M, Schiffman M, Rodríguez AC, Burk RD, Hildesheim M, Freer E, Bonilla J, Bratti C, Berzofsky JA, Pinto LA. Persistent human papillomavirus infection is associated with a generalized decrease in immune responsiveness in older women. *Cancer Research* 2006; 66:11070-11076.
112. Einstein MH, Schiller JT, Viscidi RP, Strickler HD, Coursaget P, Tan T, Halsey N, Jenkins D. Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns. *The Lancet Infectious Diseases* 2009; 9:347-356.
113. Furgyik S, Grubb R, Kullander S, Sandahl B, Winegerup L, Eydal A. Familial occurrence of cervical cancer, stages 0-IV. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1986;65:223-227.
114. Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología. Registro Histopatológico de Neoplasias en México. 1998.
115. Lazcano-Ponce EC, Rascón-Pacheco RA, Lozano-Ascencio R, Velasco-Mondragón HE. Mortality from cervical carcinoma in Mexico. Impact of screening, 1980-1990.
116. Casas L, Galvan SC, Ordoñez RM, López N, Guido M, Berumen J. Asian-american variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer* 1999;83:449-455.
117. Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmerón J, Galvan SC, Estrada RA, Yunes E, Garcia-Carrancá A, Gonzalez-Lira G, Madrigal-de la Campa A. Asian-American

- variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a Case-control study. *J Natl Cancer Insti* 2001;93:1325-1330.
118. Hernandez-HDM, García CA, González SJL, Cruz TF, Apresa GT, Martínez EOA, Ornelas BL, Guido M, Alvarado CI, Muñoz S. Virus de Papiloma Humano de Alto Riesgo y factores Asociados a Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) en mujeres de dos Hospitales de la Ciudad de México. *Rev Inv Clínica* 2002;54:468-475.
 119. Instituto Nacional de Geografía y Estadística (INEGI). Censo Nacional de población y vivienda 2000. Población protegida por los Servicios de Salud 2000-2008. Indicadores seleccionados de la población nacido en otro país diferente de México 1950-2000 (inegi.org.mx).
 120. Khoury MJ, Beaty TH. The case-control method in genetic epidemiology. *Epidemiol Rev* 1994;16:134-150.
 121. Rothman K, Greenland S. Genetic Epidemiology. In: *Modern Epidemiology*. Lippincott-Raven, 1998:609-622.
 122. Typology of observational study designs. Cross-sectional study. In: *Epidemiologic Research*. Kleinbaum D, Kupper L. Van Nostrand Reinhold, New York, 1982:62-95.
 123. Meeting Report. European VPH Clinical Summit Meeting. 30th January, 1998.
 124. Digene Corporation. Digene VPH test Hybrid Capture II. A signal Amplification Hybridization Micropalte Test for the Chemiluninescent Detection and Quantitation of Human Papilloma Virus (VPH) DNA. 1998.
 125. Mielzynska I, McLachlin MC, Lörincz A. Digene VPH test featuring Hybrid Capture II (HCII), a new highly sensitive test for detecting VPH DNA in Clinical Specimens. 1997.
 126. Davis RW, Thomas M, Cameron J, St John TP, Padgett RA. Rapid DNA isolation for enzymatic and hybridization analysis. *Methods Enzymol* 1980;65:404-411.
 127. SPSS. México ver. 15 Statistical Package for Social Sciences, 2006.

128. Excoffier L, Slatkin M. Maximum-Likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population.
129. Tefvik D. Statistical Analysis in HLA and Disease Association Studies. Available at: <http://www.dorak.info/hla/stat.html>. 2005.
130. Sham PC. Statistics in Human Genetics (Arnold Applications of Statistics Series). 1st ed. London UK: A Hodder Arnold Publication; 1998.
131. Beskow A, Josefsson A, Gyllesten U. HLA class II alleles associated with infection by HPV 16 in cervical cancer in situ. *Int J Cancer* 2001;93:817-822.
132. Cruz E, Vieira J, Gonçalves R, Alves H, Almeida S, Rodrigues P, Lacerda R, Porto G. Involvement of the major histocompatibility complex region in the genetic regulation of circulating CD8+ T-cell numbers in humans. *Tissue Antigens* 2004;64:25-34.
133. Hildesheim A, Schiffman M, Scott DR, Marti D, Kissner T, Sherman ME, Glass AG, Manos MM, Lorincz AT, Kurman RJ, Buckland J, Rush AG, Carrington M. Human Leukocyte Antigen class I/II alleles and development of HPV-related cervical neoplasia: results from a case-control study conducted in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:1035-1041.
134. Castro FA, Haimila K, Pasanen K, Kaasila M, Patama T, Partanen J, Surcel HM, Pukkala F, Lehtinen M. Geographic distribution of cervical cancer-associated human leukocyte antigens and cervical cancer incidence in Finland. *Int J STD AIDS* 2007;18:672-679.
135. Chan DP, Cheung TH, Tam AO, Cheung JL, Yim SF, Lo KW, Siu NS, Zhou DX, Chan PK. Risk association between human leukocyte antigen-A allele and high-risk human papillomavirus infection for cervical neoplasia in Chinese women. *J Infect Dis* 2005;192:1749-1756.

136. Schiff MA, Apple RJ, Lin P, Nelson JL, Wheeler CM, Becker TM. HLA alleles and risk of cervical intraepithelial neoplasia among southwestern American Indian women. *Hum Immunol* 2005;66:1050-1056.
137. Yang YC, Chang TY, Lee YJ, Su TH, Dang CW, Wu CC, Liu HF, Chu CC, Lin M. HLA-DRB1 alleles and cervical squamous cell carcinoma: experimental study and meta-analysis. *Hum Immunol* 2006;67:331-340.
138. Lin P, Koutsky LA, Critchlow CW, Apple RJ, Hawes SE, Hughes JP, Touré P, Dembele A, Kiviat NB. HLA Class II DR-DQ and increased risk of cervical cancer among Senegalese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:1037-1045.
139. Wank R, Meulen J, Luande J, Eberhardt HC, Pawlita M. Cervical intraepithelial neoplasia, cervical carcinoma, and risk for patients with HLA-DQB1*0602, *0301, *0303 alleles. *Lancet* 1993;341:1215.
140. Madeleine MM, Brumback B, Cushing-Haugen KL, Schwartz SM, Dating JR, Smith AG, Nelson JL, Porter P, Shera KA, McDougall JK, Galloway DA. Human leukocyte antigen class II and cervical cancer risk: a population-based study. *J Infect Dis* 2002;186:1565-1574.
141. Apple RJ, Becker TM, Wheeler CM, Erlich HA. Comparison of human leukocyte antigen DR-DQ disease associations found with cervical dysplasia and invasive cervical carcinoma. *J Nat Cancer Inst* 1995;87:427-436.
142. Wu Y, Liu B, Lin W, Xu Y, Li L, Zhang Y, Chen S, Lin Z, Xu A. Human leukocyte antigen class II alleles and risk of cervical cancer in China. *Hum Immunol* 2007;68:192-200.
143. Wang SS, Wheeler CM, Hildesheim A, Schiffman M, Herrero R, Bratti MC, Sherman ME, Alfaro M, Hutchinson ML, Morales J, Lorincz A, Burk RD, Carrington M, Erlich HA, Apple RJ. Human leukocyte antigen class I and II alleles and risk of cervical

- neoplasia: results from a population-based study in Costa Rica. *J Infect Disease* 2001;184:1310-1314.
144. Sun CA, Liu JF, Wu DM, Nieh S, Yu CP, Chu TY. Viral load of high-risk papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynecol Obstet* 2002;76:41-47.
145. Hernández HDM, Ornelas BL, Guido JMC, Apresa GT, Alvarado CI, Salcedo VM, Mohar BA, García CA. Association between high-risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women. *Gynecol Oncol* 2003;90:310-317.
146. Fontaine J, Gravitt P, Lee-Min D, Lefevre J, Pourreaux K, Hankins C, Coutlée F, The Canadian Women's HIV Study Group. High level of correlation of human papillomavirus-16 DNA viral load estimates generated by three real-time PCR assays applied on genital specimens. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2200-2207.
147. Mori M, Beatty PG, Graves M, Bouchur K. HLA gene and haplotypes frequencies in the North American population: the national marrow donor program donor registry 2000. <http://www.ashi-hla.org/publicationfiles/archives/prepr/motomi.htm>.
148. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Muñoz N, Bosch FX, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 1997;71:2463-2472.
149. Ellis JRM, Keating PJ, Baird J, Hounsell EF, Renouf DV, Rowe M, Hopkins D, Duggan-Keen MF, Bartholomew JS, Young LS, Stem PL. The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nat Med* 1995;1:464-470.
150. Chan PK, Cheung JL, Cheung TH, Lin CK, Siu SS, Yu MM, Tang JW, Lo KW, Yim SF, Wong YF, To KF, Ng HK, Chung TK. HLA-DQB1 polymorphisms and risk for

- cervical cancer: a case-control study in a southern Chinese population. *Gynecol Oncol* 2007; 105:736-41.
151. Bory JP, Cucherousset J, Lorenzato M, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P, Clavel C. Recurrent human papillomavirus infection detected with the hybrid capture II assay selects women with normal cervical smears at risk for developing high grade cervical lesions: a longitudinal study of 3,091 women. *Cancer* 2002;102:519-25.
152. Sun CA, Liu JF, Wu DM, Nieh S, Yu CP, Chu TY. Viral load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynaecol Obstet* 2002;76:41-7.
153. Widdice LE, Moscicki AB. Updated Guidelines for Papanicolaou Tests, Colposcopy, and Human Papillomavirus Testing in Adolescents. *Journal of Adolescent Health* 2008; (43):S41-S51.
154. Franco E, Villa L, Rohan T, Ferenczy A, Petzl-Erler M, Matlashewski G. Ludwig-McGill Study Group. Design and Methods of the Ludwig-McGill Longitudinal Study of the Natural History of Human Papillomavirus Infection and Cervical Neoplasia in Brazil. *Rev Panam Salud Publica* 1999; 6:223-232.
155. Lazcano PE, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P, Hernández P, Salmerón J, Hernández M. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer* 2001;91:412-420.
156. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Sean DC, Patel SS, Markowitz LE. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA* 2007; 297:813-819.
157. García-Piñeres AJ, Hildesheim A, Herrero R, Trivett M, Williams M, Atmetlla I, Ramírez M, Villegas M, Schiffman M, Rodríguez AC, Burk RD, Hildesheim M, Freer E, bonilla J, Bratti C, Berzofsky JA, Pinto LA. Persistent Human Papillomavirus infection

is associated with a generalized decrease in immune responsiveness in older women.

Cancer Res 2006;66:11070-11076.

158. Sasagawa T, Dong Y, Saijoh K, Satake S, Tateno M, Inoue M. Human papillomavirus infection and risk determinants for squamous intraepithelial lesion and cervical cancer in Japan. *Jpn J Cancer Res* 1997;88:376-384.
159. Giuliano AR, Papenfuss M, Schneider A, Nour M, Hatch K. Risk factors for High-Risk type human papillomavirus infection among Mexican-American women. *Ca Epidemiol Biomark Prev* 1999;8:615-620.
160. Madeleine MM, Daling JR, Schwartz SM, Shera K, McKnight G, Carter JJ, Wipf GC, Critchlow CW, McDougall JK, Porter P, Galloway DA. Human papillomavirus and long-term oral contraceptive use increase the risk of adenocarcinoma in situ of the cervix. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 2001;10:171-177.
161. Moreno V, Bosch F, Muñoz N, Meijer C, Shah K, Walboomers J, Herrero R, Franceschi S. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *The Lancet* 2002; 359:1085-1092.
162. Deacon JM, Evans CD, Yule R, Desai M, Binns W, Taylor C, Peto J. Sexual behavior and smoking as determinants of cervical HPV infection and onf CIN3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort. *Br J Cancer* 2000; 83:1565-1573.

17. TABLAS

17.1 PROBLEMA 1

Tabla 1. Población de estudio de acuerdo a unidad médica participante, tipo de paciente y frecuencia de infección por VPH alto riesgo.

Institución a la que pertenece		Tipo de HPV			Total
		Postivo a algún tipo de VPH	neg	VPH 16	
Hospital de	Caso	81	4	96	181
Oncología	Fam caso	22	127	8	157
CMN Siglo	Control	15	155	0	170
XXI	Fam control	30	127	0	157
Total		148	413	104	665
Hospital	Caso	58	2	44	104
General de	Fam caso	10	54	0	64
México	Control	10	97	0	107
	Fam control	14	96	0	110
Total		92	249	44	385

Tabla 2. Características sociales y reproductivas de la población de estudio total y seleccionada con Infección por VPH 16+ .

VARIABLES (n=406)	Población Total		X ² p ²	Seleccionada(CC HPV 16+)		X ² p ²
	CC n ₁ (n=285)	Controles n ₀ (n=277)		CC n ₁₁ (n=104)	Controles n ₀₀ (n=104)	
Edad (y)						
≤ 35	19 / 6.7	24 / 8.7	4.7	12 / 11.5	15 / 14.4	3.6
36 – 45	87 / 30.5	68 / 24.5	0.2	26 / 25.0	27 / 26.0	0.3
46 – 55	79 / 27.7	93 / 33.6		27 / 26.0	35 / 33.6	
56 - +	100 / 35.1	92 / 33.2		39 / 37.5	27 / 26.0	
Estado civil						
Soltera, Divorciada, Viuda	134 / 47.0	91 / 32.9	12.3 <0.001*	49 / 47.1	36 / 34.6	2.9 0.09
Casada, Unión libre	151 / 53.0	186 / 67.1		55 / 52.9	68 / 65.4	
Nivel Social						
Malo	78 / 27.5	35 / 12.6	19.3	28 / 26.9	16 / 15.4	4.4
Regular	144 / 50.4	162 / 58.5	<0.001*	53 / 51.0	58 / 55.8	0.1
Bueno	63 / 22.1	80 / 28.9		23 / 22.1	30 / 28.8	
Ocupación						
Hogar	237 / 83.2	194 / 70.0	13.8	79 / 76.0	67 / 64.4	4.2
Empleada	30 / 10.5	56 / 20.2	0.0009*	16 / 15.4	28 / 27.0	0.4
Otra	18 / 6.2	27 / 9.8		9 / 8.6	9 / 8.6	
Tabaquismo						
Negativo	195 / 68.4	190 / 68.6	0	63 / 60.6	70 / 67.3	0.7
Positivo	90 / 31.6	87 / 31.4	0.9	41 / 39.4	34 / 32.7	0.4
Edad de Inicio de vida sexual						
< 18	162 / 56.8	93 / 33.6	29.7	57 / 54.8	33 / 31.7	10.3
18 y +	123 / 43.2	184 / 66.4	<0.001*	47 / 45.2	71 / 68.3	0.001*
Partos						
≤ 3	86 / 30.2	133 / 48.0	18.0	18 / 17.3	40 / 38.5	10.5
≥ 4	199 / 69.8	144 / 52.0	<0.001*	86 / 82.7	64 / 61.5	0.001*
Parejas Sexuales						
1	131 / 46.0	192 / 69.3	32.2	43 / 41.3	57 / 54.8	4.1
2	99 / 34.7	60 / 21.7	<0.001*	42 / 40.4	30 / 28.8	0.1
3 y +	55 / 19.3	25 / 9.0		19 / 18.3	17 / 16.4	
Anticonceptivos						
orales						
Si	75 / 26.3	65 / 23.5	0.5	35 / 37.8	15 / 33.3	0.09
No	210 / 73.7	212 / 76.5	0.5	69 / 62.2	30 / 66.7	0.7
Etapa Clínica						
IA-IB	44 / 15.4			26 / 25.0		
IIA-IIB	141 / 49.5			50 / 48.1		
IIIA-IIIB	84 / 29.5			22 / 21.2		
IVA-IVB	16 / 5.6			6 / 5.8		

Tabla 3. Frecuencias génicas de los alelos HLA clase I (A y B) en pacientes con cáncer cervical VPH 16 positivas comparadas con controles sin cáncer

Alelos	Casos	Controles	Alelos	Casos	Controles
A2	0.3317	0.3382	B35	0.1971	0.2727
A24	0.2066	0.1862	B39*	0.0865	0.1681
A68	0.1635	0.1568	B40	0.0817	0.1045
A1	0.0769	0.0393	B15	0.0865	0.0681
A31	0.0481	0.0785	B07	0.0385	0.0636
A29	0.0288	0.0098	B44	0.0817	0.0544
A30	0.0288	0.0441	B14	0.0577	0.0500
A3	0.0240	0.0295	B49	0.0240	0.0500
A26	0.0240	0.0637	B51	0.0577	0.0318
A11	0.0192	0.0000	B48	0.0385	0.0318
A32	0.0192	0.0196	B18*	0.0769	0.0181
A69	0.0100	0.0049	B27	0.0048	0.0147
A36	0.0096	0.0000	B 8	0.0288	0.0136
A23	0.0048	0.0196	B52	0.0288	0.0136
A34	0.0048	0.0000	B53	0.0240	0.0136
A33	0.0000	0.0098	B56	0.0048	0.0091
			B13	0.0144	0.0091
			B78	0.0096	0.0044
			B37	0.0048	0.0044
			B50	0.0048	0.0044
			B38	0.0144	0.0000
			B41	0.0096	0.0000
			B47	0.0096	0.0000
			B29	0.0048	0.0000
			B55	0.0048	0.0000
			B57	0.0048	0.0000

*Valor de p corregida <0.05 .

Tabla 4. Frecuencias génicas de los alelos HLA clase II (DRB1 y DQB1) en pacientes con cáncer cervical VPH 16 positivas comparadas con controles sin cáncer

Alelos	Casos	Controles	Alelos	Casos	Controles
DR4	0.3029	0.2789	DQ 0302	0.3029	0.2794
DR8	0.1971	0.2452	DQ 0402	0.2067	0.2402
DR13	0.0769	0.0962	DQ 0301	0.1875	0.2451
DR3	0.0625	0.0481	DQ 0201	0.1202	0.0980
DR16	0.0625	0.0625	DQ 0501	0.0866	0.0833
DR1	0.0577	0.0673	DQ 0602	0.0481	0.0245
DR15*	0.0577	0.0144	DQ 0601	0.0192	0.0098
DR7	0.0529	0.0577	DQ 0603	0.0096	0.0196
DR14	0.0529	0.0721	DQ 0604	0.0096	0.0000
DR11	0.0385	0.0240	DQ 0304	0.0048	0.0000
DR10	0.0336	0.0240	DQ 0503	0.0048	0.0000
DR12	0.0048	0.0048			
DR09	0.0000	0.0048			

*Corrected p value = 0.03.

Tabla 5. Asociación de los haplotipos de HLA clase I (HLA-A, -B) y HLA clase II (HLA-DRB1, -DQB1) con càncer cervical.

Haplotipo	Casos	Controles	X^2	cP	RM
A2-B39	4	14	10.44	0.004	0.28 (0.12–0.64)
A2-B18	7	1	7.02	0.016	5.3 (1.4–23.4)
A24-B15	6	0	8.94	0.006	13.8 (1.9–285)
A24-B39	3	10	6.47	0.022	0.31 (0.12–0.79)
A1-DR13	6	0	8.94	0.003	13.8 (1.9–285)
A2-DQB*0501	10	2	9.2	0.003	4.56 (1.6–14.1)
B35-DR8	9	27	9.71	0.002	0.27 (0.11–0.65)
DR15-DQB*0602	9	2	7.47	0.007	4.1 (1.4–12.7)

RM, Razón de momios; cP = valor de p corregido.

Tabla 6. Asociación de los haplotipos HLA-A, -B, -DR, and -DQ en pacientes con cáncer cervical e infección positiva a VPH16 comparado con mujeres sin cáncer.

Haplotipo	Casos	Controles	X^2	cP	RM
A2-B39-DR4-DQ*0302	1	8	8.87	0.009	0.16 (0.04–0.6)
A24-B35-DR4-DQ*0302	0	8	13.06	0.003	0.05 (0.003–0.39)
A2-B44-DR4-DQ*0302	5	0	6.95	0.027	11.5 (1.5–244)
A24-B35-DR16-DQ*0301	5	0	6.95	0.027	11.5 (1.5–244)
A68-B40-DR4-DQ*0302	0	7	10.98	0.003	0.06 (0.003–0.45)
A2-B40-DR4-DQ*0302	6	1	5.26	0.06	4.6 (1.2–20.4)

RM, Razón de momios; cP = valor de p corregido.

17. TABLAS

17.2 PROBLEMA 2

Tabla 2.1.- Características diferenciales de las variables sociodemográficas y reproductivas entre las familiares de primer grado de mujeres con y sin CCU

VARIABLES	Familiares de mujeres con CCU n = 221 (± d.s.) ⁽¹⁾		Familiares de mujeres sin CCU n = 264 (± d.s.) ⁽¹⁾		U-Mann Whitney Test (p)
	X		X		
Edad (a)	37.1	(12.0)	32.5	(9.1)	<0.001*
Escolaridad (a)	7.9	(3.8)	9.6	(3.3)	<0.001*
Índice de hacinamiento	2.5	(1.3)	2.5	(1.2)	0.3
Ingreso mensual (Salario mínimo)	18.29	(8.33)	19.97	(8.84)	0.3
Edad de inicio tabaquismo ¹	20.5	(7.6)	18.7	(4.4)	0.4
Tiempo de tabaquismo (m) ¹	134	(121)	116	(91)	0.7
Edad de la menarca (a)	12.8	(1.4)	12.6	(1.4)	0.02*
Edad de inicio de vida sexual (a)	18.6	(3.7)	19.7	(3.9)	<0.001*
Edad primer embarazo (a) ²	19.7	(4.1)	21.2	(4.3)	<0.001*
Embarazos	3.5	(2.6)	2.4	(1.8)	<0.001*
Partos	2.6	(2.5)	1.5	(1.7)	<0.001*
Césareas	0.54	(0.9)	0.58	(0.8)	0.3
Abortos	0.45	(0.8)	0.34	(0.6)	0.2
Parejas sexuales	1.6	(1.2)	1.5	(1.09)	0.005*
Hormonales orales (m) ³	34.3	(34.2)	33.4	(48.8)	0.2
Hormonales inyectables (m) ³	20.7	(23.9)	18.6	(26.2)	0.4
Condón (m) ³	53.4	(50.5)	38.4	(52.7)	0.1
Edad Primer PAP ⁴	28.8	(9.9)	25.8	(6.7)	0.002*
Total PAPs ⁴	3.9	(4.4)	3.7	(4.1)	0.6
Carga viral HPV	105.6	(186.1)	90.2	(195.2)	0.1

a = años, m = meses, 1 = solo fumadores; 2= solo mujeres con antecedente de embarazo positivo, 3= usuarias, 4 = 34.1 y 35.6% de las mujeres en cada grupo el primer PAP se realizó por invitación al estudio;

* = estadísticamente significativa.

Table 2.2. Características sociales y reproductivas de la población total y en la muestra seleccionada para determinación de HLA, de familiares de mujeres con y sin CCU de acuerdo a Infección por DNA-VPH alto riesgo

VARIABLES	Población Total		X ² (p) ²	Seleccionada HLA		X ² (p) ²
	VPH + n ₁ (n=84)	VPH - n ₀ (n=404)		VPH + n ₁₁ (n=11)	VPH - n ₀₀ (n=43)	
Edad (y)						
≤ 35	58 / 19.8	235 / 80.2	6.16	9 / 27.3	24 / 72.7	7.9
36 – 45	15 / 12.9	101 / 87.1	(0.2)	1 / 7.7	12 / 92.3	(0.09)
46 – 55	6 / 11.1	48 / 88.9		0 / 0	4 / 100	
56 - 65	2 / 12.5	14 / 87.5		0 / 0	3 / 100	
66 - +	3 / 33.3	6 / 66.7		1 / 100	0 / 0	
Estado civil						
Soltera	17 / 28.3	43 / 71.7	8.9	1 / 33.3	2 / 66.6	0.89
Casada	40 / 13.6	254 / 86.4	(0.029)*	7 / 20.0	28 / 80.0	(0.82)
Unión libre	15 / 21.7	54 / 78.3		1 / 12.5	7 / 87.5	
Otra	12 / 18.5	53 / 81.5		2 / 25.0	6 / 75.0	
Escolaridad						
Analfabeta/Prim. Incomp.	34 / 57.6	25 / 42.4	73.7	1 / 7.7	12 / 92.3	0.82
Primaria o mayor	50 / 11.7	379 / 88.3	(<0.001)*	10 / 24.4	31 / 75.6	(0.36)
Condición Vivienda						
Malo	15 / 38.5	24 / 61.5	11.8	3 / 75.0	1 / 25.0	8.2
Bueno	69 / 17.3	380 / 84.6	(0.001)*	8 / 15.2	42 / 84.8	(0.004)
Ocupación						
Hogar	48 / 15.1	270 / 84.9	2.87	6 / 14.6	35 / 85.4	3.4
Empleada / Otra	36 / 21.2	134 / 88.8	(0.09)	5 / 38.5	8 / 61.5	(0.06)
Tabaquismo						
Negativo	52 / 17.1	252 / 82.9	0.004	4 / 17.4	19 / 82.6	0.2
Positivo	32 / 17.4	152 / 82.6	(0.9)	7 / 22.6	24 / 77.4	(0.63)
Edad IVSA						
≤ 15	14 / 20.0	56 / 80.0	1.9	3 / 21.4	11 / 78.6	1.6
16 – 18	36 / 19.3	151 / 80.7	(0.38)	2 / 11.1	16 / 88.9	(0.44)
19 y +	34 / 14.7	197 / 85.3		6 / 27.3	16 / 72.7	
Embarazos						
0	7 / 25.0	21 / 75.0	2.01	0 / 0	3 / 100	1.1
1 - 2	40 / 18.3	178 / 81.7	(0.36)	6 / 25.0	18 / 75.0	(0.56)
≥3	37 / 15.3	205 / 84.7		5 / 18.5	22 / 81.5	
Parejas Sexuales						
1	39 / 14.1	238 / 85.9	5.2	5 / 16.1	26 / 83.9	0.9
2 - 3	35 / 20.2	138 / 79.8	(0.07)	6 / 27.2	16 / 72.8	(0.6)
4 y +	10 / 26.3	28 / 76.2		0 / 0	1 / 100	
Anticonceptivos orales						
Sí	15 / 11.5	116 / 88.5	4.17	1 / 7.1	13 / 92.9	2.0
No	69 / 19.3	288 / 80.7	(0.04)*	10 / 25.0	30 / 75.0	(0.15)

Tabla 2.3. Análisis de Regresión Logística de los principales factores asociados con la infección por VPH de alto riesgo en familiares de primer grado de mujeres con y sin CCU.

FACTORES	n = 488	ORa	I.C.95%
Condiciones de la vivienda¹			
Buen estado	449	1	-
Mal estado	39	3.0	1.3 – 6.9*
Estado Civil 2			
Casada	294	1	-
Otra	194	1.8	1.1 – 2.9*
Inicio Vida Sexual (a) 2			
≤ 15	70	2.2	1.0 – 5.1*
16 - 18	187	2.8	1.1 – 6.8*
19 y mas	231	1.0	-
Número de parejas sexuales			
Una	277	1	
2-3 parejas	173	3.07	1.05-5.73
4 o más	38	3.71	1.07-7.33
Hormonales 1			
No usuarias	357	1.0	-
Orales	131	0.5	0.2 – 1.0*

1 = OR = odds ratios, ajustada por edad, estado civil, tipo de familiar, antecedente de CCU, e inicio de vida sexual.

2 = OR = odds ratios, ajustada por edad, ocupación, tipo de familiar.

Table 2.4. Frecuencia de los alelos HLA-A en pacientes con cáncer cervical VPH 16 positivas, controles y sus respectivos familiares.

Alelos	Casos	Controles	Fam Casos	Fam Controles
A2	0.3317	0.3382	0.315	0.296
A24	0.2066	0.1862	0.130	0.111
A68	0.1635	0.1568	0.130	0.185
A1	0.0769	0.0393	0.056	0.019
A31	0.0481	0.0785	0.111	0.111
A29	0.0288	0.0098	0.111	0.074
A30	0.0288	0.0441	0.056	0.019
A3	0.0240	0.0295	0.019	0.019
A26	0.0240	0.0637	0.019	0.074
A11	0.0192	0.0000	0.000	0.056
A32	0.0192	0.0196	0.000	0.019
A69	0.0100	0.0049	0.019	0.000
A36	0.0096	0.0000	0.000	0.000
A23	0.0048	0.0196	0.019	0.019
A34	0.0048	0.0000	0.019	0.000
A33	0.0000	0.0098	0.000	0.000

Tabla 2.5. Frecuencia de los alelos HLA-B en pacientes con cáncer cervical VPH 16 positivas, controles y sus respectivos familiares.

Alelos	Casos	Controles	Fam Casos	Fam Controles
B35	0.1971	0.2727	0.241	0.241
B39*	0.0865	0.1681	0.000	0.222
B40	0.0817	0.1045	0.111	0.037
B15	0.0865	0.0681	0.037	0.074
B07	0.0385	0.0636	0.019	0.019
B44	0.0817	0.0544	0.111	0.130
B14	0.0577	0.0500	0.019	0.037
B49	0.0240	0.0500	0.019	0.037
B51	0.0577	0.0318	0.056	0.019
B48	0.0385	0.0318	0.093	0.056
B18*	0.0769	0.0181	0.019	0.019
B27	0.0048	0.0147	0.019	0.000
B 8	0.0288	0.0136	0.019	0.019
B52	0.0288	0.0136	0.056	0.019
B53	0.0240	0.0136	0.056	0.000
B56	0.0048	0.0091	0.000	0.000
B13	0.0144	0.0091	0.000	0.000
B78	0.0096	0.0044	0.000	0.000
B37	0.0048	0.0044	0.000	0.000
B50	0.0048	0.0044	0.00	0.019
B38	0.0144	0.0000	0.093	0.037
B41	0.0096	0.0000	0.000	0.000
B47	0.0096	0.0000	0.000	0.000
B29	0.0048	0.0000	0.000	0.000
B55	0.0048	0.0000	0.000	0.019
B57	0.0048	0.0000	0.019	0.000
B59	0.0000	0.0000	0.019	0.000
B15	0.0000	0.0000	0.037	0.074

Tabla 2.6 Frecuencia de los alelos HLA-DRB1 en pacientes con cáncer cervical VPH 16 positivas, controles y sus respectivos familiares.

Alelos	Casos	Controles	Fam Casos	Fam Controles
DR4	0.3029	0.2789	0.333	0.296
DR8	0.1971	0.2452	0.111	0.278
DR13	0.0769	0.0962	0.130	0.093
DR3	0.0625	0.0481	0.037	0.056
DR16	0.0625	0.0625	0.019	0.019
DR1	0.0577	0.0673	0.037	0.074
DR15	0.0577	0.0144	0.056	0.037
DR7	0.0529	0.0577	0.056	0.037
DR14	0.0529	0.0721	0.167	0.093
DR11	0.0385	0.0240	0.037	0.019
DR10	0.0336	0.0240	0.019	0.000
DR12	0.0048	0.0048	0.000	0.000
DR09	0.0000	0.0048	0.000	0.000

Tabla 2.7. Frecuencia de los alelos HLA-DQB1 en pacientes con cáncer cervical VPH 16 positivas, controles y sus respectivos familiares.

Alelos	Casos	Controles	Fam Casos	Fam Controles
DQ 0302	0.3029	0.2794	0.352	0.278
DQ 0402	0.2067	0.2402	0.111	0.278
DQ 0301	0.1875	0.2451	0.315	0.204
DQ 0201	0.1202	0.0980	0.093	0.093
DQ 0501	0.0866	0.0833	0.056	0.074
DQ 0602	0.0481	0.0245	0.000	0.019
DQ 0601	0.0192	0.0098	0.037	0.056
DQ 0603	0.0096	0.0196	0.019	0.000
DQ 0604	0.0096	0.0000	0.019	0.000
DQ 0304	0.0048	0.0000	0.000	0.000
DQ 0503	0.0048	0.0000	0.000	0.000

Tabla 2.8 Frecuencias Estimadas de los Haplotipos para HLA clase I (HLA-A / B) y HLA clase II (HLA-DRB1 / DQB1), en pacientes con CCU, Controles y Familiares en relación con la infección por DNA-VPH alto riesgo.

Haplotipos	Ca	Con	Fam Ca	Fam Con	VPH +	VPH -	p
A2-B39	4	14	0	5	0	5	0.57
A2-B18	7	1	1	0	1	0	0.1
A24-B15	6	0	0	0	0	0	
A24-B39	3	10	0	0	0	0	
A1-DR13	6	10	0	0	0	0	
A2-DQB*0501	10	2	0	0	0	0	
B35-DR8	9	27	0	8	2	6	0.6
DR15-DQB*0602	9	2	0	0	0	0	

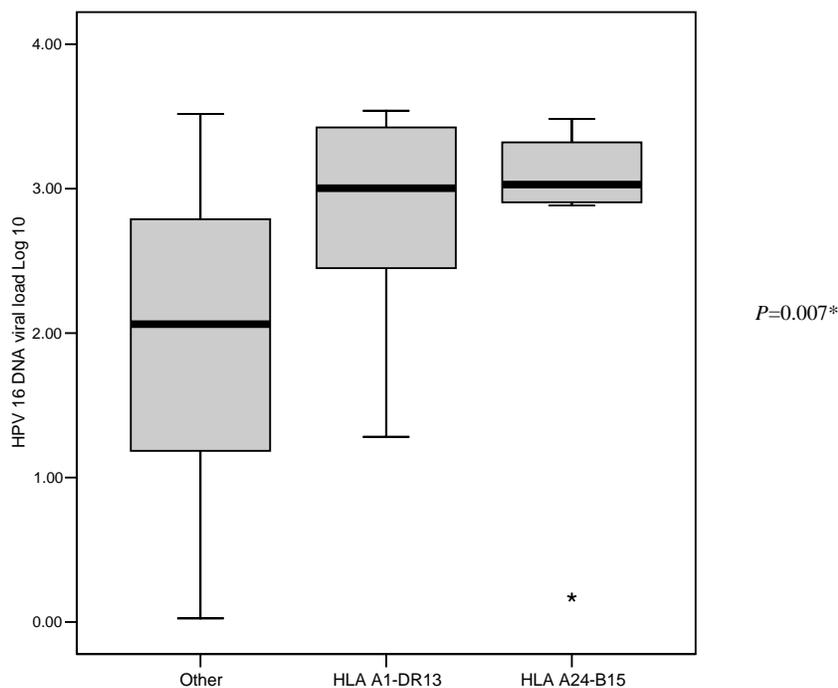
Tabla 2.9 Frecuencias Estimadas de los Haplotipos completos para HLA clase I (HLA-A / B) y HLA clase II (HLA-DRB1 / DQB1), en pacientes con CCU, Controles y Familiares en relación con la infección por DNA-VPH alto riesgo.

Haplotipos	Ca	Con	Fam Ca	Fam Con	VPH +	VPH -	p
A2-B39-DR4-DQ*0302	1	8	0	3	0	3	1.0
A24-B35-DR4-DQ*0302	0	8	1	1	0	2	0.7
A2-B44-DR4-DQ*0302	5	0	0	0	0	0	
A24-B35-DR16-DQ*0301	5	0	0	0	0	0	
A68-B40-DR4-DQ*0302	0	7	0	0	0	0	
A2-B40-DR4-DQ*0302	6	1	0	0	0	0	
A24-B40-DR4-DQ*0302	3	0	3	1	3	1	0.01*

18. GRAFICOS

PROBLEMAS 1 Y 2

Gráfico 1. Comparación de la Carga Viral para DNA VPH 16 en mujeres con CCU ($n = 104$), de acuerdo con HLA A1-DR13, HLA A24-B15 y portadores de otros haplotipos.

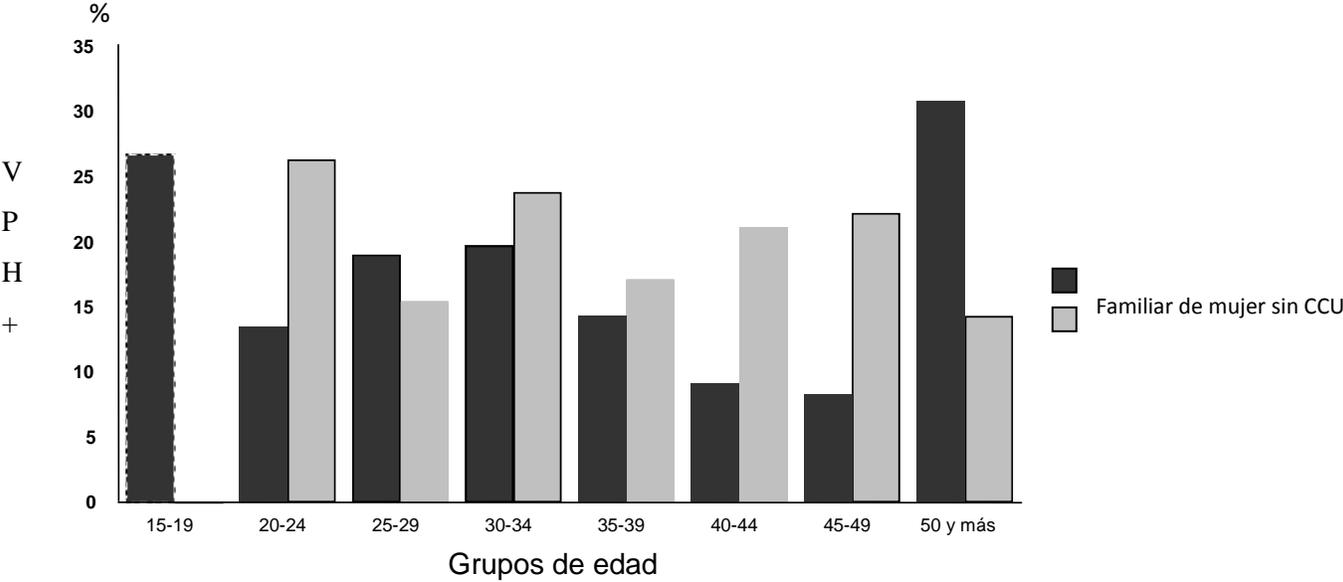


Carga viral	Otros haplotipos HLA		HLA A1-DR13		HLA A24-B15	
	URL	URL Log10	URL	URL Log10	URL	URL Log10
Min	1.06	0.025	19.1	1.28	1.48	0.17
Q1	15.3	1.18	58.1	1.76	383.6	2.58
Md	112.45	20.5	912.3	2.96	1912.4	3.28
Q3	614.47	2.79	2674.2	3.43	2144.3	3.33
Max	3288.3	3.52	3463.7	3.54	3037.5	3.48

URL = Unidades Relativas de luz. Min = valor mínimo, Q1 = primer cuartil, Md = Mediana, Q3 = tercer cuartil.

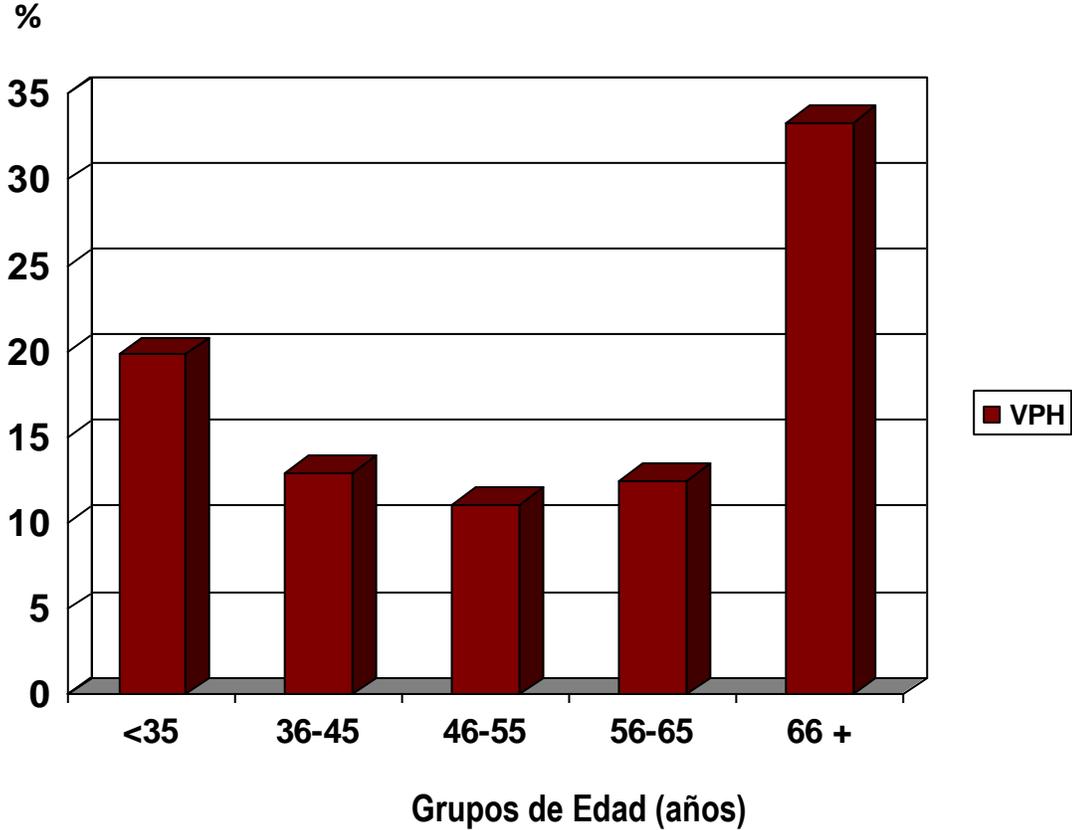
*Prueba de Kruskal-Wallis, nivel de confianza 95%

Gráfico No. 2.1. Distribución de Positividad a VPH por grupos de edad, de acuerdo a familiares de primer grado de mujeres con y sin CCU .



Comparación entre grupos, $X^2 = 4.4$, $p=0.8$.

Gráfico 2.2. Prevalencia de Infección por Virus de Papiloma Humano, de acuerdo a grupo de edad en familiares de pacientes con y sin cáncer de cérvix.



19. ANEXOS

ANEXO 1

DEFINICIONES DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICION	CATEGORIA
EDAD	Tiempo transcurrido desde el nacimiento.	Años cumplidos por la paciente al momento del estudio.	Cuantitativa	Ordinal	=< 29 30-39 40-49 50-59 60 y +
NIVEL DE ESCOLARIDAD	Grado máximo de estudios Alcanzado. El mínimo grado de estudios que permite una Mejor relación del individuo con su medio ambiente es de 18 años.	Grado máximo de Estudios.	Cualitativa	Nominal	Analfabeta Primaria incompleta Primaria Secundaria Preparatoria Profesional
ESTRATO SOCIOECONOMICO	Es la condición de respuesta económica del individuo o la familia ante la sociedad	Calificación obtenida por medio del INSE	Cualitativa	Nominal	Alto Medio Bajo
HABITO TABAQUICO	El humo del tabaco es un aerosol que consiste en una fase gaseosa y otra particulada, cuyos constituyentes son tóxicos para diversas células del organismo, pueden actuar como iniciadores carcinógenos y como promotores del proceso de carcinogénesis	Se preguntará a la paciente el número de cigarrillos consumidos por día , así como el tiempo de duración del habito tabáquico.	Cualitativa Cuantitativa	Nominal Ordinal	No fuma Fumadora Ex fumadora < 5 años 5-10 años 11 y más años
Antecedentes Heredofamiliares de Cáncer	Se refiere al antecedente de la paciente de que algún familiar cercano haya padecido algún tipo de cáncer.	Se preguntará a la paciente si tiene conocimiento sobre si algún familiar padece ó padeció cáncer. En caso de que la pregunta sea afirmativa se preguntará el parentesco	Cualitativa Cualitativa	Nominal Nominal	Si No No sabe Padre Madre Hermanos Abuelos Tíos Otro

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICION	CATEGORIA
Antecedentes de Carcinoma de cérvix	Se refiere al antecedente de que algún familiar cercano haya padecido cáncer de cérvix	Se le preguntará a la paciente si tiene el conocimiento de que algún familiar padezca o haya padecido cáncer de cérvix. En caso de que la pregunta sea afirmativa, se preguntará el parentesco	Cualitativa Cualitativa	Nominal Nominal	Si No No sabe Madre Abuela paterna Abuela materna Hermanas Tías Otro
INICIO DE VIDA SEXUAL.	Se refiere al primer contacto sexual que experimenta la mujer- Edad de primera relación Sexual.	Se le preguntará la edad a la que tuvo su primera relación sexual de la entrevistada.	Cualitativa	Nominal.	< 18 18 y +
GESTAS	Número de embarazos Que ha tenido la mujer.	Numero de embarazos que ha tenido la entrevistada.	Cuantitativa	Ordinal	Ninguno 1-2 3-4 >= 5
PARTOS	Nacimientos por vía vaginal del producto de la gestación	Número de partos vaginales de la entrevistada.	Cuantitativa	Ordinal	Ninguno 1-2 3-4 >= 5
CESAREA	Se refiere al nacimiento del producto de la gestación por vía abdominal	Número de cesáreas que le hayan realizado a la Entrevistada	Cualitativa	Ordinal	Ninguna 1-2 3-4 >= 5
ABORTOS	Terminación del embarazo en forma natural y espontánea antes de la semana 20 de la gestación ó que el feto sea viable.	Número de abortos que ha tenido la paciente hasta el momento de la de la entrevista.	Cuantitativa	Ordinal	Ninguno 1-2 3-4 >= 5
NUMERO DE COMPAÑEROS SEXUALES	Cantidad de parejas sexuales que haya tenido la mujer en el transcurso de su vida.	Se solicitará a la paciente durante la entrevista, que indique el número de personas con las que ha tenido relaciones sexuales en el transcurso de su vida	Cuantitativa	Ordinal.	Ninguno 1 2 3 4 5 o mas

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICION	CATEGORIA
CITOLOGIAS CERVICOVAGINALES	El estudio de las células cervicales exfoliadas es la base de detección de las lesiones precursoras del cáncer cervicouterino, se pueden encontrar lesiones benignas (inflamación, metaplasia escamosa madura, hiperplasia endocervical y otros cambios de tipo reactivo) y alteraciones malignas (displasia, carcinoma in situ e invasor o otros procesos malignos del aparato genital) ó reportarse lesiones sin alteraciones	Se investigará en la libreta de registro de DOC y/o en los expedientes clínicos de las pacientes los resultados citológicos previos.	Cualitativa	Nominal	Clase: I,II,III,IV y V. De PAP Además clasificación descriptiva-
LESIONES EPITELIALES	Espectro de cambios celulares intraepiteliales que se inician generalmente como una neoplasia bien diferenciada y finaliza como Un carcinoma invasor	NIC I : Displasia Leve. NIC II : Displasia Moderada. NIC III: Displasia severa y carcinoma In situ.	Cualitativa	Nominal	NIC.

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICION	CATEGORIA
INFECCION CERVICAL POR VPH	<p>VPH es un virus de DNA cuya inoculación ocurre Por microtraumatismo durante el coito con una persona infectada. Los viriones penetran la capa basal, atraviesan la membrana celular y el genoma viral se transporta hacia el núcleo de la célula, donde es traducido y transcrito; se replica conforma la célula huésped se divide. Puede producir lesiones como el papiloma exofítico o ser ser subclínicas, sólo identificables por medio de colposcopia. En la citología cervical se reconoce la atipia coilocítica que se caracteriza por: coilocitos hiperchromacia y discreto alargamiento nuclear y aumento de las mitosis Los diferentes tipos de VPH se dividen por su potencial oncogénico, encontrándose hasta en un 80 o 90 % de los carcinomas cervicales invasores. En el caso de NIC, estos tipos se pueden encontrar asociados con otros tipos de bajo potencial oncogénico Se ha propuesto que existen interacciones entre VPH, tabaquismo y anticonceptivos orales dentro de la etiología de NIC.</p>	<p>Se considerará el reporte de :</p> <p>1.-Atipia coilocítica, condiloma plano, condiloma acuminado observado en el tejido de biopsia obtenido por colposcopia. El diagnóstico debe ser emitido por el servicio Patología.</p> <p>2.- .Se relizará una técnica de Captura de Híbridos II (2ª. Generación) para la identificación del genoma viral, en células cervicales obtenidas por cepillado endocervical. Así como carga viral.</p> <p>3. Se realizará la técnica de Captura de Híbridos para identificar la presencia y el tipo de virus, en células cervicales obtenidas por biopsia.</p> <p>Otros hallazgos: Ectropión (Tamaño, considere el diámetro mayor), Pólipos (número y tamaño) Quistes (Número y tamaño) Fibromas (número y tamaño)</p>	Cualitativa	Nominal	Atipia coilocítica Condiloma plano Condiloma acuminado-
			Cualitativa	Nominal	CH II Positiva CHII Negativa
			Cualitativa	Nominal	1. Negativas 2. VPH alto riesgo 3. VPH bajo riesgo
			Cuantitativa	Intervalo Carga viral	RLU >1
			Cuantitativa	Ordinal	1-2 + 3 + 4y+

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICION	CATEGORIA
Alelos de HLA clase I y II (HLA-A, A2, A19, A9, A10, A28, HLA-B, B35, B16, B40, HLA-DR5, DR7, HLA-DQA1, DQB1). HLA (Human Leucocyte Antigen).	HLA clase I y II son las dos principales moléculas del MHC, son heterodímeros transmembranales cuyo dominio extracelular amino-terminal atrae antígenos para presentarlos a las Células T. Hay tres tipos de proteínas clase I, HLA-A, HLA-B y HLA-C y tres tipos clase II, HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR. Los genes que codifican para HLA clase I y II, se encuentran en el cromosoma 6. Se realizará el análisis de la distribución de los alelos para clase I y II, determinados en DNA de leucocitos en sangre periférica.	Determinación positiva por bandeado de acuerdo al método de hibridización in situ en el DNA de leucocitos de sangre periférica.	Cualitativa	Categórica	Presente Ausente

ANEXO 2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA. PROGRAMAS DE POST-GRADO
HOSPITALES DE ONCOLOGIA. DISTRITO FEDERAL.
PARTE A

CUESTIONARIO PARA VPH Y HLA EN MUJERES CON CANCER CERVICAL
INVASOR Y SUS DESCENDIENTES.

IDENTIFICACION.

NOMBRE: _____

EDAD: _____

LUGAR DE NACIMIENTO: _____

DOMICILIO: _____

DIAGNOSTICO PROBABLE:

DATOS FAMILIARES:

Parentesco	Nombre	Edad	Sexo	Lugar de Nacimiento	Lugar de Residencia actual	Antecedente De cáncer
Abuelo Paterno						
Abuela Paterna						
Abuelo Materno						
Abuela Materna						
Padre						
Madre						
Esposos (s)						
Hermanos (s)						
Hermanas (s)						
Hijos (s)						
Hijas (s)						

**ANEXO 3
CUESTIONARIO PARA HLA EN MUJERES CON CA CERVICAL INVASOR Y
SUS DESCENDIENTES**

CODIGOS DE LLENADO

VARIABLE	NOMBRE EN BASE DE DATOS	EQUIVALENCIA	CODIGO																																
FOLIO	FOLIO	1000- Casos IMSS 2000 Controles IMSS 3000- Casos INCan 4000 - Controles INCan	Hijos caso 1000.1,1000.2, 1000.3 Hijos control 2000.1, 2000.2 Hijos caso 3000.1, 3000.2, 3000.3 Hijos controles 4000.1, 4000.2, 4000.3																																
NUMERO DE EXPEDIENTE	EXPEDIENTE	Número de expediente institucional Que identifica al caso o control																																	
UNIDAD DE MEDICINA DE PRIMER NIVEL	UMF, CENTROS DE SALUD	Número de UMF consignado																																	
EDAD	EDAD	Edad en años																																	
DONDE NACIO LUGAR DE RESIDENCIA	NACIO RESIDE	<table border="1"> <tr><td>1. D. F.</td><td>17. Michoacan</td></tr> <tr><td>2. Edo. De Mex.</td><td>18. Morelos</td></tr> <tr><td>3. Aguascalientes</td><td>19. Nayarit</td></tr> <tr><td>4. B.C. Norte</td><td>20. N. Leon</td></tr> <tr><td>5. B.C. Sur</td><td>21. Oaxaca</td></tr> <tr><td>6. Campeche</td><td>22. Puebla</td></tr> <tr><td>7. Coahuila</td><td>23. Querétaro</td></tr> <tr><td>8. Colima</td><td>24. Q. Roo</td></tr> <tr><td>9. Sin Informac.</td><td>25. S.L.P.</td></tr> <tr><td>10. Chiapas</td><td>26. Sinaloa</td></tr> <tr><td>11. Chihuahua</td><td>27. Sonora</td></tr> <tr><td>12. Durango</td><td>28. Tabasco</td></tr> <tr><td>13. Guanajuato</td><td>29. Tamaulipas</td></tr> <tr><td>14. Guerrero</td><td>30. Tlaxcala</td></tr> <tr><td>15. Hidalgo</td><td>31 Veracruz</td></tr> <tr><td>16. Jalisco</td><td>32 Yucatan</td></tr> </table>	1. D. F.	17. Michoacan	2. Edo. De Mex.	18. Morelos	3. Aguascalientes	19. Nayarit	4. B.C. Norte	20. N. Leon	5. B.C. Sur	21. Oaxaca	6. Campeche	22. Puebla	7. Coahuila	23. Querétaro	8. Colima	24. Q. Roo	9. Sin Informac.	25. S.L.P.	10. Chiapas	26. Sinaloa	11. Chihuahua	27. Sonora	12. Durango	28. Tabasco	13. Guanajuato	29. Tamaulipas	14. Guerrero	30. Tlaxcala	15. Hidalgo	31 Veracruz	16. Jalisco	32 Yucatan	33. Zacatecas.
1. D. F.	17. Michoacan																																		
2. Edo. De Mex.	18. Morelos																																		
3. Aguascalientes	19. Nayarit																																		
4. B.C. Norte	20. N. Leon																																		
5. B.C. Sur	21. Oaxaca																																		
6. Campeche	22. Puebla																																		
7. Coahuila	23. Querétaro																																		
8. Colima	24. Q. Roo																																		
9. Sin Informac.	25. S.L.P.																																		
10. Chiapas	26. Sinaloa																																		
11. Chihuahua	27. Sonora																																		
12. Durango	28. Tabasco																																		
13. Guanajuato	29. Tamaulipas																																		
14. Guerrero	30. Tlaxcala																																		
15. Hidalgo	31 Veracruz																																		
16. Jalisco	32 Yucatan																																		
ESCOLARIDAD (Ultimo año de escuela aprobado) Los códigos se usaran para la Escolaridad de la Paciente y del Jefe de Familia	ULTIMOGRAD	Primaria	6																																
		Primaria + Secundaria	9																																
	ESCJEFEFAM	P + Sec + Comercial	11																																
		P + Sec + Técnica	12																																
		P +Sec + Prepa o Bachillerato	12																																
		P + Sec + Prepa + licenciatura	17																																
		P + sec +Prepa +Lic+Postgrado	20																																
		Sabe leer y escribir	88																																
		Analfabeta	00																																
		Sin información	99																																
OCUPACION JEFE FAMILIA	OCUPAJEF	El señalado, especificando si recibe un sueldo base																																	
(Necesario para el Indice de Nivel socioeconómico)	JEFEFAM	Padre, Madre, Hijo, otro																																	

CUANTAS PERSONAS VIVEN EN LA CASA	NUMPER	Se codificará de acuerdo al cuestionario.	
CUANTAS HABITACIONES UTILIZAN PARA DORMIR	HUMHABI	Se codificará de acuerdo al cuestionario.	
INDICE DE HACINAMIENTO	INDICEHACI	Se obtiene dividiendo el número de personas que viven en la casa entre el número de habitantes	Cociente Con Decimales
MATERIAL DEL PISO	MATPISO	Se codifica el número seleccionado en el cuestionario	
AGUA POTABLE	AGUAPOT	Se codifica el número seleccionado en el cuestionario	
ELIMINACION DE EXCRETAS	EXCRETA	Se codifica el número seleccionado en el cuestionario	
NUMERO DE PERSONAS QUE APORTAN ECONOMICAMENTE	PERSECON	Se codifica el número seleccionado en el cuestionario	
NIVEL SOCIO ECONOMICO	INSE	Cálculo del Índice de Nivel Socioeconómico, de acuerdo a los indicadores que se estipulan en el artículo publicado.	1. Bueno 2. Regular 3. Malo
FUMA O HA FUMADO ALGUNA VEZ	FUMA	Se codifica el número seleccionado en el cuestionario	
A QUE EDAD EMPEZO A FUMAR	EMPFUMAR	Se codificará de acuerdo a la edad en que haya empezado ha fumar. Cuando no aplica se pondrá 000	
ACTUALMENTE SIGUE FUMANDO	ACTFUMA	Se codifica el número seleccionado en el cuestionario Cuando no aplica se pondrá 000	
TIEMPO TOTAL DE TABAQUISMO	TIEMPOTABA	Se obtiene de restar a la edad actual, la edad en que empezó a fumar. Si ya no fuma restar a la edad actual el “hace cuanto que no fuma	
FAMILIAR CON CANCER	FAMCANC	Se codifica el número seleccionado en el cuestionario	Si No
ANTECEDENTES DE CANCER	PARENTESCO	Ninguno, Padre, Madre, Hermanos, tíos, otros.	
TIPO DE CANCER	TIPOCAN	De acuerdo al sitio anatómico afectado	

USTED SE HA EMBARAZADO	EMBARAZ	1. SI 2. NO	
CUANTAS VECES SE HA EMBARAZADO	NUMEMBA	Se codificará de acuerdo al número en el cuestionario.	
USTED SE HA EMBARAZADO	EMBARAZ	3. SI 4. NO	
CUANTAS VECES SE HA EMBARAZADO	NUMEMBA	Se codificará de acuerdo al número en el cuestionario.	
CUANTOS PARTOS HA TENIDO	PARTOS	Se codificará de acuerdo al número en el cuestionario.	
CUANTAS VECES LE HAN HECHO CESÁREA.	CESAREA	Se codificará de acuerdo al número en el cuestionario.	
CUANTOS ABORTOS HA TENIDO	ABORTO	Se codificará de acuerdo al número en el cuestionario.	
A QUE EDAD SE EMBARAZO POR PRIMERA VEZ	EDADEMB	Se codificará de acuerdo al número en el cuestionario.	
EDAD INICIO DE RELACIONES SEXUALES	INICRELA	Se expresará en años de acuerdo a lo indicado en el cuestionario.	
NUMERO DE COMPAÑEROS SEXUALES	NUMCOM	Se expresará de acuerdo a lo indicado en el cuestionario.	
SABE SI SU COMPAÑERO ACTUAL HA TENIDO RELACIONES CON OTRAS MUJERES	OTRASMUJ	Se expresará de acuerdo a lo indicado en el cuestionario.	
ATENCION POR OTRA ENFERMEDAD	OTRAENFE TIPO DE ENFERMEDAD TIEMPO DE EVOLUCION TRATAMIENTO	1. SI 2. NO Especificar Meses Si, No	
EDAD PRIMER PAPANICOLAOU	EDADPAP	Se dará en años.	
FECHA DE LOS DOS ULTIMOS PAPs	FECPAP1 FECPAP2	Se tomará el mes y el año.	

CUANTOS PAPANICOLAUS SE HA REALIZADO.	NUMPAP	Se tomará el número del cuestionario.	
LUGAR DONDE LE TOMARON EL ULTIMO PAPANICOLAU	LUGPAP	1. IMSS 2. ISSSTE 3. SSA 4. MEDIO PRIVADO 5. OTRO	
RESULTADO DE PAPANICOLAU ANORMAL	PAPANOR	1. SI 2. NO	
TIEMPO DE REPORTE Y ENVIO	ENVIO	Se dará en días Para los controles se codificará con 00	
VIRUS DE PAPILOMA HUMANO	ALTO RIESGO BAJO RIESGO NEGATIVO	POSITIVO NEGATIVO	
TIPO DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO	16,18,31,33,36,45,52	POSITIVO RLU NEGATIVO	
HLA	CLASE I CLASE II	A B DR DQ	

ANEXO 4

FOLIO _____

CARTA DE INFORMACION Y CONSENTIMIENTO INFORMADO.

ASOCIACION DE HLA CLASE I Y II CON CANCER CERVICAL, SU RELACION CON VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) EN FAMILIARES DE PRIMER GRADO.

Fecha: _____

Nombre del paciente: _____

Hospital: _____

Nombre de Encuestador: _____

He sido invitada a participar en un estudio con el fin de identificar la presencia de un virus que puede o no estar relacionado con la presencia de algunos casos de cáncer en el área genital, así como identificar en muestras de sangre algunas características que pueden estar relacionadas con la transmisión a la familia (herencia).

Estoy enterada que el estudio consiste en tomar una muestra de células del tejido en el cuello de la matriz, para la identificación del virus del papiloma humano (VPH). Este procedimiento se llevará a cabo además del procedimiento diagnóstico habitual para mi atención médica. Dos muestras serán consideradas, una consiste en un cepillado y otra en una pequeña muestra de tejido (biopsia). Las molestias posteriores a este procedimiento pueden ser de un sangrado ligero a moderado, que irá disminuyendo poco a poco como si fuera un sangrado de menstruación. Puede presentarse dolor ligero a moderado en el vientre bajo o bien en la parte baja de la espalda.

Por otro lado será tomada una muestra de sangre (2 ml.) en condiciones asépticas, la cual será analizada para ver algunos factores de herencia.

Se me ha comunicado asimismo que estos procedimientos no son de alto riesgo, que forman parte de los métodos de diagnóstico y que la decisión del tratamiento no dependerá de los resultados, por lo que mi médico tratante me informará el plan a seguir sin interferencia de este estudio.

Uno de los principales motivos del estudio es conocer algunas causas que pueden estar relacionadas con la presencia de mi enfermedad y por otro lado identificar si existen mayores posibilidades de que algún miembro de mi familia (esposo e hijos) puedan tener algún factor relacionado con cáncer que se desarrolle con el tiempo.

Asimismo, se me ha informado que es importante la participación de algunos o todos los miembros directos de mi familia (esposo, hijas-os), siempre y cuando ellos (as) estén de acuerdo, para lo cual serán citados y recibirán una explicación amplia del o de los

procedimientos para cada caso, el cual es diferente para hombres que para mujeres. En el caso de menores de edad (menores de 18 años) se tomará el acuerdo de ambos o uno de los padres. En los mayores de edad, se requiere de la firma de una carta parecida a ésta.

Los investigadores del estudio me han hecho saber que tengo derecho a preguntar sobre los avances del trabajo en cualquier momento y que mi negativa o el de alguno de mis familiares a paticipar en el estudio no implicará ninguna diferencia en mi atención médica.

Por otro lado se me ha comentado que toda la información verbal recabada será totalmente independiente entre la familia y estrictamente confidencial, por lo que no podré solicitar información acerca de mis familiares, a menos que sea de común acuerdo.

Este estudio está basado en las consideraciones de ética médica previstas en los acuerdos de buena práctica médica y revisado por los comités de investigación médica correspondientes.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los riesgos y beneficios del estudio, el cual acepto de manera voluntaria y soy libre de retirar mi consentimiento en cualquier momento, sin que ello afecte mi atención médica actual ni la que recibiré en un futuro.

En el momento que lo requiera podré solicitar información con los investigadores responsables de lunes a viernes de 12 a 14:00hrs.

Dra. Dulce Ma. Hernández Hdz.,
Hospital de Oncología,
56 27 69 00 ext 4400

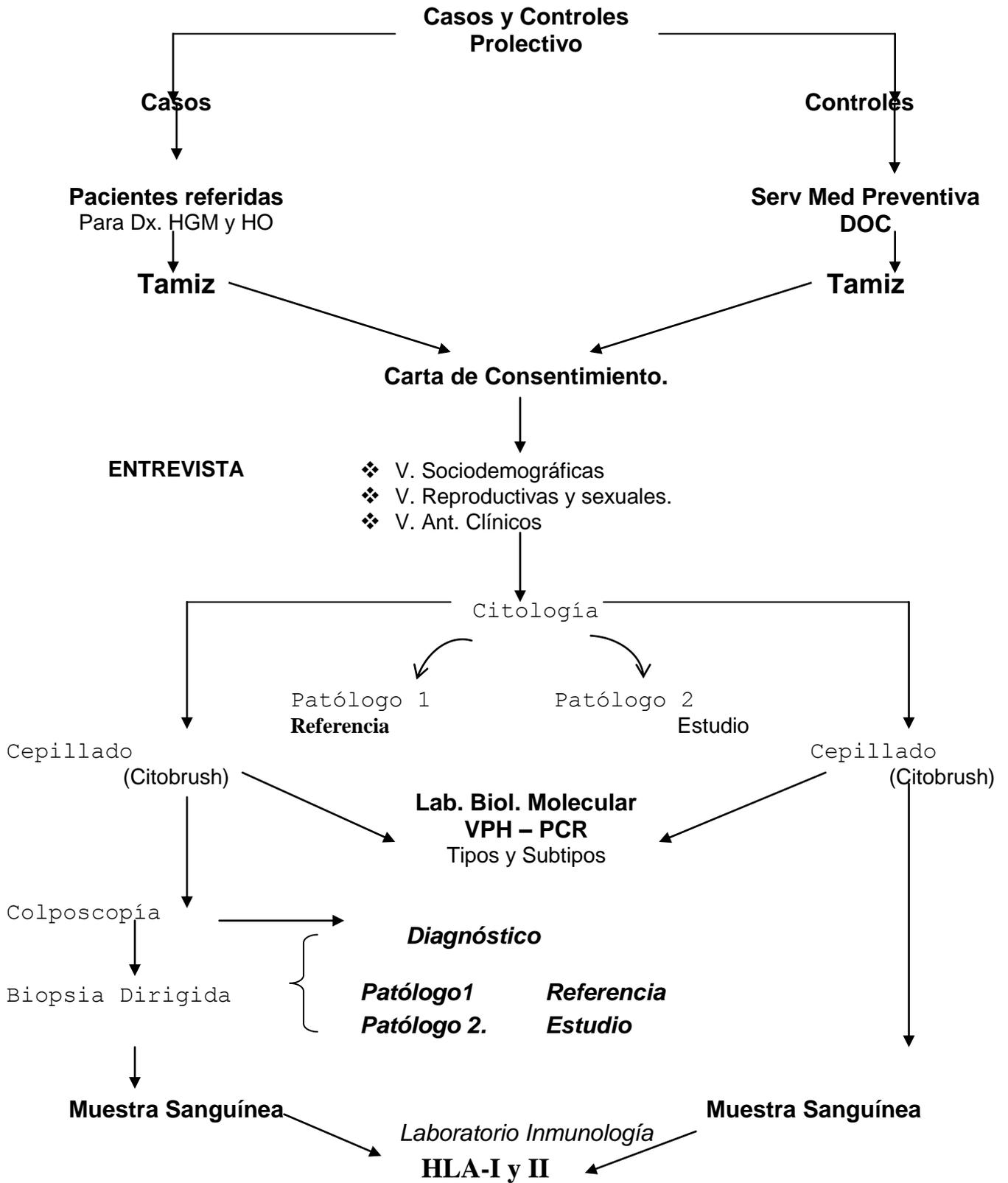
Nombre y firma de la paciente

Nombre y firma del representante del investigador

Testigo

Testigo

ANEXO 5. MATERIAL Y METODOS



**ANEXO 6
FAMILIARES**

Carta de Aceptación

Casos

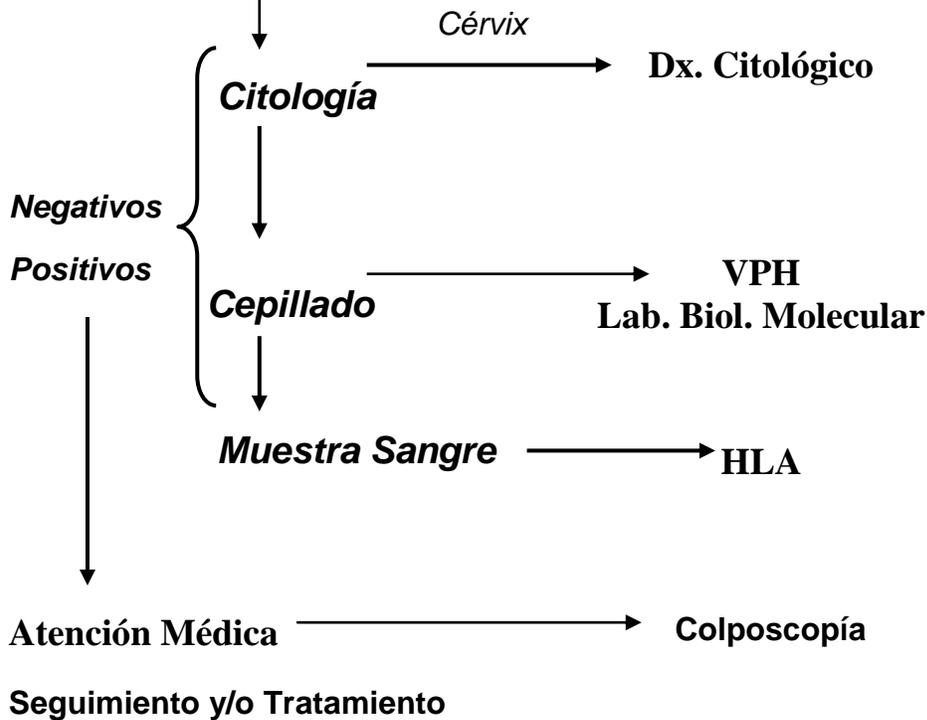
Controles

Entrevista

- ❖ V. Sociodemográficas
- ❖ V. Reproductivas y Sexuales
- ❖ V. Ant. Clínicas.

**Hijas \geq 18 años o con
IVSA**

Primer Nivel de Atención



ANEXO 7

Extracción de DNA Genómico. Kit BDtract™

Su uso se aplica para el aislamiento y purificación de DNA del Genoma de sangre total humana, células de cultivo de tejidos y células de bacterias.

El protocolo se basa en un nuevo método que simplifica el proceso de purificación. El cuál incluye:

1. Lisis de células sanguíneas totales o membrana citoplásmica con solución de BD-1.
2. Lavado de eritrocitos con solución BD-2.
3. Lisis de células nucleadas con detergente anionico solución BD-3.
4. Remoción de contaminación de RNA con solución RNAsa.
5. Debridación protéica por "salamiento" con solución BD-4.
6. Precipitación Genómica de DNA con isopropanol y disolución en TE buffer.

Almacenamiento del Kit Bdtract™

Todos los componentes de este kit, excepto la solución de RNAsa, puede almacenarse a temperatura ambiente, se mantiene estable al menos por un año.

La solución de RNAsa debe ser almacenada a 4°C.

Procedimiento.

1. Colecte 2.5 ml de sangre total con agente anti-coagulante (i.e. EDTA-ácido etilen diamino tetra-ácetico, a concentración de 1 mg/ml de sangre), y transferirla a un tubo de centrifuga de 15ml.
2. Añada 2.5 ml. de solución BD-1 e inviertalo varias veces hasta que se mezcle completamente.
3. Centrifugue por 10 minutos a 2,200xg usando una centrifuga con
4. Elimine lentamente el sobrenadante y mantenga el botón nuclear.
5. Añada 2.5 ml de solución BD-2 para lavar el botón. Centrifugue a 2,200xg como en el paso anterior durante 10 min.
6. Decante el sobrenadante y resuspenda cuidadosamente el botón con 0.6 ml. de solución BD-3, utilizando la pipeta. Incube a 65°C durante 15 minutos. (Nota: Si se forma un precipitado en la solución BD-3, incubéla a 37°C antes de su uso).
7. Añada 0.2 ml. de solución BD-4 en el tubo y mezclelos bien.
8. Centrifugue por 10 minutos a máxima velocidad en una microcentrifuga. Colecte cuidadosamente el sobrenadante y deseche el botón. (Si permanece un precipitado en el sobrenadante, centrifugue nuevamente hasta que esté claro).
9. Añada 0.6 ml de Isopropanol al sobrenadante a temperatura ambiente.
10. Mezcle la muestra invirtiendo el tubo 40-50 veces hasta que la línea blanca de DNA precipite.
11. Centrifugue durante 10 minutos a máxima velocidad en una microcentrifuga.
12. Elimine el sobrenadante y lave el DNA con 1 ml. de etanol FRÍO 70%.
13. Centrifugue durante 5 minutos a velocidad máxima en una microcentrifuga y vacíe el sobrenadante.
14. Deje secar brevemente el botón y añada 0.5 ml de agua estéril o TE buffer a el DNA.
15. Caliente el tubo a 65°C durante 15-30 minutos e inviertalo varias veces durante la incubación. (Es importante invertir varias veces debido al alto peso molecular del DNA genómico para su disolución).
16. Agite brevemente el DNA y use una alícuota para determinar la concentración y pureza del DNA.