



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**DETECCIÓN DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN
CITOLOGÍAS**

EXFOLIATIVAS DEL CÉRVIX UTERINO

PRESENTA:

MANUEL EDUARDO SALGADO BERNABÉ

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. PATRICIA PIÑA SÁNCHEZ

Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Oncología Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Este proyecto fue apoyado por Fondos Sectoriales CONACYT S2008-87474.

Agradecimientos.

Por su apoyo en la realización de la presentes tesis, ya que sin su ayuda no hubiese sido posible su desarrollo.

Patóloga. Candelaria Córdoba Uscanga

Dra. Lucia Taja Chayeb

Dr. Mauricio Salcedo Vargas

A mis asesores quienes siempre me impulsaron para realizar una tesis de calidad, dándome consejos y apoyo.

Dr. Diego Julio Arenas Aranda

Dr. Federico Ávila Moreno

Dr. Carlos Pérez Plasencia

Dr. Jorge Eduardo Campos

INDICE

Cáncer.....	5
Cérvix uterino.....	6
Clasificación de lesiones precursoras	7
Tamizaje de lesiones precursoras.....	8
Factores de riesgo asociados a CaCu.....	9
Clasificación de VPH.....	11
Estructura y función.....	12
Epidemiología de VPH.....	14
VPH en México.....	15
Prevención del CaCu.....	16
Detección molecular de VPH.....	17
Normatividad en la prevención del CaCu.....	19
Justificación.....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos particulares.....	20
Materiales y métodos.....	21
Material biológico.....	21
Extracción de ADN.....	22
Detección de VPH por PCR.....	22
Secuenciación.....	23
Análisis de secuencias	24
Resultados	25
Detección de VPH.....	26
Detección de coinfecciones.....	30
Relación del diagnóstico citopatológico y VPH.....	32
Análisis de secuencias.....	32
Discusión.....	34
Conclusión.....	37
Referencias.....	38

Cáncer

El cáncer es la consecuencia de alteraciones genéticas y epigenéticas que provocan la transformación de células normales a células malignas, estos cambios son; autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales anticrecimiento, evasión de muerte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis, invasión de tejido y metástasis (Hanahan y Wenberg, 2000).

Desde el punto de vista clínico el cáncer es la principal causa de muerte por enfermedad a nivel mundial, dentro de los cuales los principales tipos de cáncer son; pulmón, colon, recto, estómago, mama y cervix. (IARC, 2009). El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la tercera neoplasia en mujeres a nivel mundial con 529,800 nuevos casos (Global Cancer Statistics, 2008) (figura 1) y es un problema de salud pública en países en vías de desarrollo, ya que 80% de los casos se presenta en dichos países (Parkin, 2005). En nuestro país, esta neoplasia es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres con 11.2%, sólo después de cáncer de mama (INEGI, 2010) (figura 2).

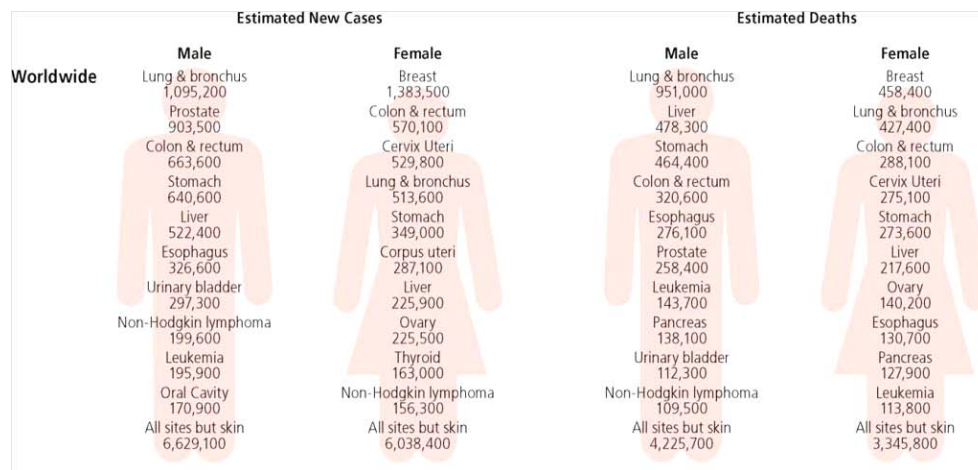
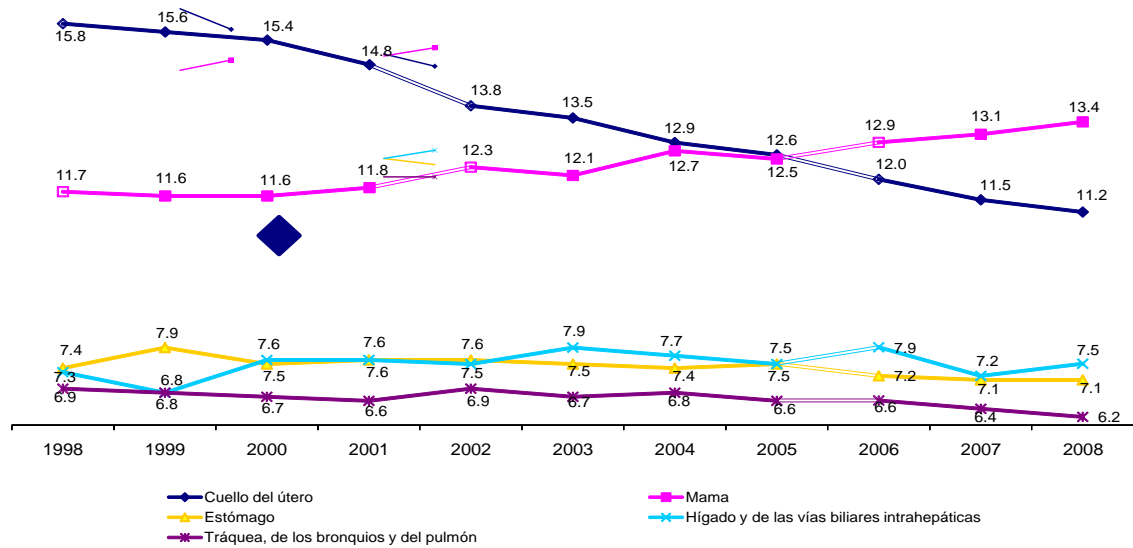


Figura 1. Nuevos casos y estimado número de muertes por año en hombres y en mujeres GLOBOCAN 2008.

Porcentaje de defunciones en mujeres debidas a tumores malignos (cinco principales causas) 1998-2008



Nota: El porcentaje está en relación con el total de defunciones por tumores registradas en cada año, en general y por sexo.
Fuente: INEGI. Estadísticas Vitales, 1998-2008. Bases de datos.

Figura 2. Porcentaje de muertes por tumores malignos en mujeres hasta 2008 (INEGI, 2011).

Cérvix uterino

El cuello uterino o cérvix, constituye la porción inferior del útero que asoma a la vagina. En el cérvix se distinguen dos partes:

Una interna llamada endocérvix que constituye un canal entre la cavidad uterina y la vagina además de ser un epitelio columnar en monocapa con funciones glandulares y otra externa, orientada hacia la vagina que se conoce como exocérvix formado por un epitelio estratificado escamoso que normalmente está influenciado por actividad hormonal. La transición entre el endocérvix y el exocérvix tiene lugar a nivel del orificio cervical externo en la pequeña porción de transición escamo-columnar, la cual se modifica a lo largo de la vida como consecuencia de partos y actividad sexual. Por debajo de los epitelios escamoso y columnar se encuentra la membrana basal que es la encargada de dividir a ambos epitelios del estroma, el cual es rico en fibras de colágeno elásticas y fibras musculares lisas lo que le confiere consistencia firme (Linhartova, 1978). En la zona de transición escamo-columnar es donde inicia la transformación que da

origen a lesiones precursoras del CaCu las cuales han sido objeto diferentes clasificaciones (figura 3).

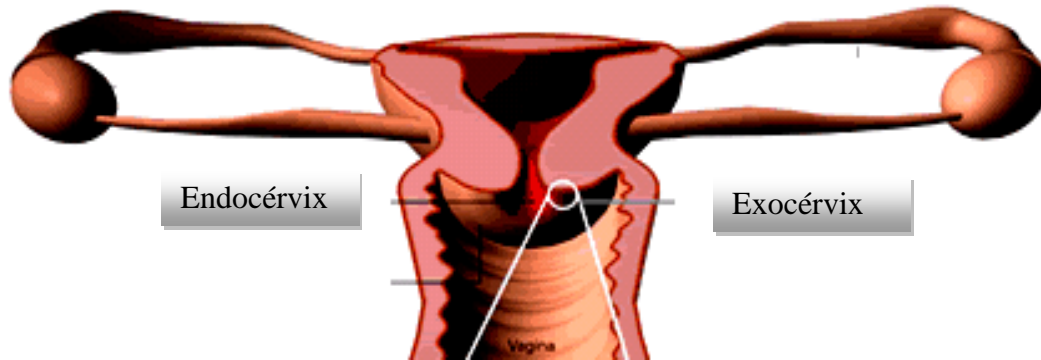


Figura 3. Morfología del cérvix uterino.

(Tomado de <http://www.msd.com.ar/msdar/patients/cancer/infeccionporvph.html>)

Clasificación de lesiones precursoras

George Papanicolaou describió una clasificación citológica que consta de 5 grados progresivos; I, II, III, IV y V de acuerdo a distintas anomalías celulares (Papanicolaou, 1942), debido a que esta clasificación provocaba diferencias en los criterios del observador, Richart propuso en 1967 el término de neoplasia intraepitelial cervical de grado I, II y III (NIC I, II y III). Dado que aún existían diferencias en el criterio para determinar el tipo de lesión, en 1988 se realizó la clasificación de Bethesda que divide las lesiones precursoras en; intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIEBG) y lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIEAG) (National Cancer Institute Workshop, 2004) (figura 4). Se sabe que 10 a 20% de las pacientes con NIC I progresan hasta NIC II/III de los cuales 30 a 40% pueden progresar a cáncer (McCredi y colaboradores, 2008).

Tamizaje de lesiones precursoras

La prueba para la detección oportuna de lesiones precursoras del CaCu conocida como prueba de Papanicolaou (*PAP*) (Papanicolaou, 1942) ha permitido reducir la incidencia y mortalidad por CaCu en dos tercios del total de estas neoplasias a nivel mundial (Burd, 2003).

La prueba de *PAP* se realiza mediante la tinción de células endo y exocervicales que son obtenidas por el raspado de un cepillo especial o espátula, una vez obtenidas las células estas se montan y fijan en laminillas para su posterior análisis. Las muestras deben contar con una cantidad adecuada de ambos epitelios columnar y estratificado para realizar el diagnóstico, de lo contrario la muestra se considera no adecuada para diagnóstico (Cross, 1989).

Esta prueba tiene limitaciones por la toma inadecuada de las muestras analizadas que consiste en casi 8% y resultados falsos negativos de hasta 20-30 % (Burd, 2003). En México, se han reportado falsos negativos de 3 hasta 53%, pese a ello se ha logrado la disminución de muertes por cáncer principalmente por el aumento en la cobertura en México mediante el uso de *PAP* (36% de 1990 - 2006) y por la reducción en la tasa de partos (Lazcano, 2008). Actualmente es de gran importancia que la estrategia de tamizaje se realice de la manera más adecuada para prevenir errores de diagnósticos.

Para pacientes con resultado del *PAP* no determinado (aquellas muestras en las cuales las alteraciones celulares no permitieron dar un diagnóstico concreto), así como para confirmar lesiones precursoras o alteraciones que sean sospechosas y se requiera realizar toma de biopsia, se puede recurrir al método de colposcopia. Sin embargo, esta prueba es costosa y no está al alcance de la población abierta (Ronco y Rossi, 2008). Aunado a esto, en México datos actuales muestran que el análisis colposcópico tiene una alta sensibilidad de 72%, aunque la especificidad es muy baja de 6%, lo que provoca que el diagnóstico y tratamiento de lesiones

precursoras no sea el adecuado (Mendoza, 2008). Por lo cual es necesario mejorar la calidad en la prueba de PAP, para ello se han desarrollado otros métodos de detección y prevención cada uno con sus respectivas ventajas y desventajas, las cuales se describen a continuación.

Citología líquida. Permite distribuir a las células en una capa fina para su mejor observación y diagnóstico (Sherman, 1994). Actualmente, esta técnica se considera una opción de mejora en la sensibilidad y especificidad en las pruebas de tamizaje por citología. Sin embargo, el acceso a este tipo análisis es limitado, debido al alto costo de reactivos y equipo especializado, además que el beneficio de esta prueba respecto al PAP convencional, actualmente se encuentra en discusión (Sykes, 2008; Harbin, 2008; Garbar, 2005).

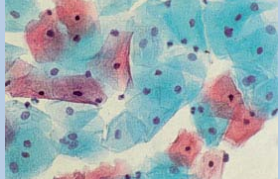
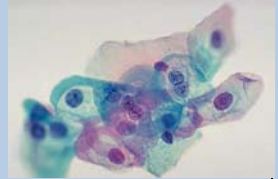
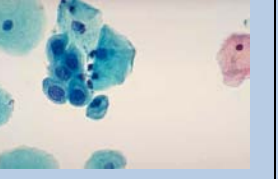
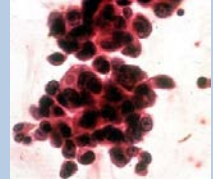
NORMAL	LIEBG	LIEBG	CACU
			
Células normales sin alteraciones neoplásicas	Halo peri nuclear (coilocito) daño causado por infección de VPH	Núcleos grandes hiper cromáticos, pérdida de la diferenciación y pérdida de la relación núcleo citoplasma.	Pérdida total de la morfología celular, células multinucleadas.

Figura 4. Grado de progresión de lesiones precursoras en citología exfoliativas.

Factores de riesgo asociados a CaCu

Desde 1974 se sugirió la asociación de VPH y CaCu (Zur Hausen) y fue hasta 1995 que la IARC (International Agency Research Cancer) estableció que VPH es un agente carcinogénico tipo I. Este virus es el principal factor asociado a CaCu y sus lesiones precursoras, ya que se ha detectado en aproximadamente 99% de CaCu a nivel mundial (Walboomer, 1999). Los VPH son virus de DNA de doble

cadena que infecta epitelios de tipo epidérmico y mucoso. Se ha estimado que aproximadamente 80% de las mujeres con vida sexual, alguna vez ha tenido infección por VPH (Stanley, 2010).

Sin embargo, la infección por este agente por sí misma no es suficiente para el desarrollo de CaCu ya que sólo un pequeño porcentaje de las infecciones persiste y puede generar lesiones precursoras ó CaCu; por lo que existen factores asociados en el desarrollo de CaCu adicional a la infección con VPH (Figura 5).

a) Uso prolongado de anticonceptivos hormonales. La región reguladora del genoma viral contiene elementos de respuesta a glucocorticoides, inducibles por hormonas esteroides como la progesterona (componente activo de los anticonceptivos orales) y la dexametasona (Negrini 1990).

b) Número de partos; Se ha observado que la prevalencia de VPH en mujeres es mayor de acuerdo al número de partos que haya tenido la mujer a lo largo de su vida ya que en cada parto el cérvix sufre alteraciones morfológicas y estructurales.

c) Inicio de la vida sexual a temprana edad. Esto se basa en riesgo de infección y el tiempo de exposición al VPH.

d) Elevado número de parejas sexuales. Conforme aumenta el número de parejas sexuales también se incrementa la probabilidad de contraer la infección por el virus o incluso de adquirir infecciones múltiples.

e) Predisposición genética. La carga genética afecta la susceptibilidad a ser infectado por VPH, debido a deficiencias en el sistema inmune que permite la evolución del ciclo viral que llevan consigo el desarrollo de lesiones precursoras (Magnusson, 2008).

Figura 5. Factores de riesgo asociados al desarrollo de cáncer cervicouterino.

Clasificación de VPH

La taxonomía de los Papiloma Virus, está organizada como miembro de la familia *Papillomaviridae* que consta de 16 géneros, de los cuales, el género alfa contiene a los virus que infectan epitelios humanos (Figura 6) y está conformado por 15 especies que a su vez se dividen en tipos, subtipos y variantes de acuerdo a la diferencia en la secuencia del gen L1 (gen codificante de la principal proteína estructural de la cápside), >10%, 2-10% y <10% respectivamente (Ulrich, 2005).

Actualmente se conocen 130 tipos virales, los cuáles se han dividido epidemiológicamente de acuerdo al grado de asociación con el CaCu; a) Alto Riesgo VPH16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82, b) Probable Alto Riesgo VPH6, 23 y 53 c) Bajo riesgo VPH6, 11, 12, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81 (Muñoz, 2004).

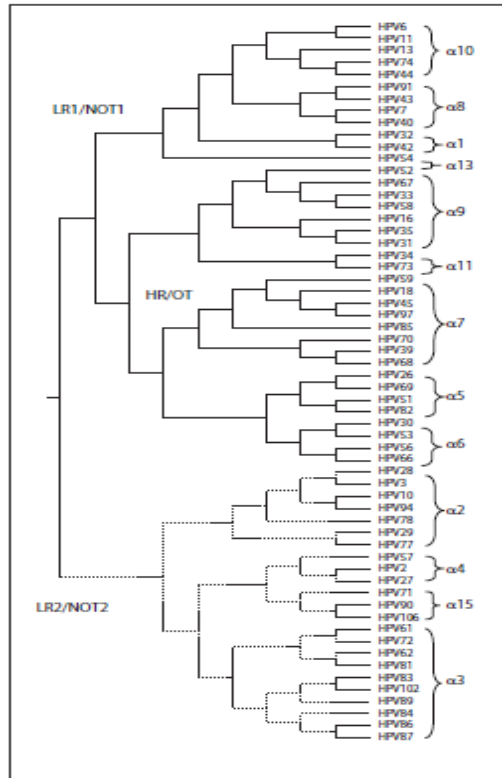


Figura 6. Árbol filogenético del genero alfa del Virus de Papiloma, donde se encuentran los principales tipos virales que infectan a los humanos (tomado de Burk y colaboradores 2009).

Estructura y función

El genoma de VPH está conformado por 8 kpb divididas en tres regiones principales; región temprana (E), región tardía (L) y región larga de control (LCR), la cual no se transcribe. Los 2 genes tardíos (L1 y L2) dan origen a las proteínas de la cápside conformada por 72 capsómeros (Hummel y cols, 1992) Los genes tempranos E1, E2, E4, E5, E6 y E7, son los que se encargan de regular el ciclo del virus en las células huésped, de los cuales los tres últimos son los principales responsables de la capacidad oncogénica del virus al inducir inmortalización celular (Doorbar, 2005).

La infección se lleva a cabo en las células basales del epitelio cervical por la interacción de la proteína L1 con proteoglicanos de unión a la membrana,

mientras algunos tipos virales la endocitosis se lleva a cabo por la vía de las clatrininas (Horvat y colaboradores, 2010).

Una vez que el virus ingresa a la célula su genoma se mantiene en forma episomal, los genes E1 y E2 se expresan formando un complejo proteico E1-E2 el cual se une a la región larga de control para iniciar el proceso de replicación, E1 tiene actividad helicasa mientras E2 regula la transcripción de los genes tempranos ocupando el sitio del promotor que regula a estos genes (Wilson y colaboradores, 2002) cuando el nivel de E2 es bajo, se une al promotor mencionado e induce la transcripción del resto de los genes tempranos, por otra parte, en altas concentraciones esta misma proteína reprime la transcripción de los genes tempranos bloqueando la unión del de la maquinaria de transcripción al sitio de inicio de la transcripción (Steger y Corbach, 1997). La función de E4 aun no está totalmente clara pero se sabe que regulan la expresión de las proteínas tardías (Fhermann y colaboradores, 2003). Adicionalmente E5 es una proteína hidrofóbica que se une a membranas evitando que esta sea sensible a factores de crecimiento normales (Conrrad y colaboradores, 1993; Leechanachai y colaboradores, 1992; Tomakidi y colaboradores, 2000; DiMaio y colaboradores, 2001). Mientras que, en particular E6 y E7 inactivan a las proteínas supresoras de tumor pRb y p53, respectivamente, (Ganguli y Parihar, 2009).

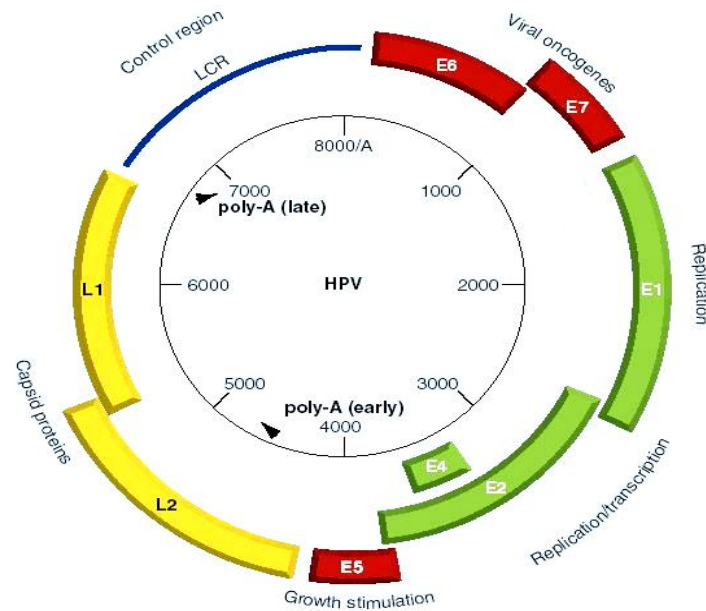


Figura 7. Genoma de VPH. Tomado de Human Papillomavirus and Cervical Cancer, Burd 2003. L1 y L2, genes estructurales de la cápside (barras en amarillo). E1, E2 y E4, genes reguladores del ciclo viral (barras en verde). E5, E6 y E7, oncogenes virales (barras en rojo). LCR, Región Larga de Control (Línea azul).

EPIDEMIOLOGÍA DE VPH

A nivel mundial los tipos virales VPH 16 y 18 se han encontrado presentes en 70% de los casos de CaCu, seguido por VPH 31 y 33 (Bosch y colaboradores, 1995), VPH 6 y 11 son los principales causantes de verrugas anogenitales (Heinzel y colaboradores, 1995) y los tipos 2, 27 y 57 se han asociado a verrugas comunes (Chang y colaboradores, 1997). Mientras que en epitelio cervical normal se ha encontrado en promedio 10% de infección en mujeres con epitelio sin anomalías citológicas (Sanjose y colaboradores, 2007).

Como se había mencionado anteriormente, una variante viral difiere en menos del 2% de la secuencia del gen L1 y se han caracterizado variantes geográficas de los tipos 16 y 18 las cuales son: Europea (E), Asiática (As), Americana (A), Asiático-Americana (AA) y Africana (Af). Algunas de estas variantes se han

asociado a la persistencia de infección por VPH (Londesborough y cols, 1996, Xi, 2006). De manera particular en un estudio realizado con muestras tumorales de 22 países, la variante Europea de VPH16 se encontró en 92% de los casos (Yamada y colaboradores, 1997).

VPH EN MÉXICO

En nuestro país se ha realizado la detección de VPH en citologías exfoliativas cervicales, donde la prevalencia va desde 8 – 23%, dentro de este porcentaje los principales tipos encontrados han sido de alto riesgo, de los cuales se destacan VPH16, 18, 58 y 31 (Lazcano y colaboradores, 2001 Piña 2006; 2010; Velázquez 2009; Lazcano, 2010), mostrando una mayor frecuencia en mujeres menores de 25 años de edad y en aquellas que rebasan los 50 (Lazcano y colaboradores, 2001). Sin embargo las diferencias en estos porcentajes de infección por VPH posiblemente se deba a la diferentes estrategias para la detección viral utilizadas en cada estudio.

Pese a la asociación de VPH con lesiones precursoras y CaCu, estudios realizados en México han reportado la infección por VPH del 29 al 90% en LIEBG y LIEAG, destacando los tipos de alto riesgo 16,18, 31, 35, 55 y 58 (Aguirre, 2007; Velázquez, 2009; Piña, 2006; López 2008; Illiades, 2010; González, 2004; Canul, 2010). Sin embargo en el estudio realizado por Canul en 2010, adicional a la detección de VPH, se identificó falta de correlación entre el diagnóstico colposcópico y citopatológico en muestras diagnosticadas como LIEAG y CaCu, lo que sugiere que la variación entre los resultados de detección de VPH en este tipo de lesiones pueden ser ocasionada por errores en la clasificación diagnóstica.

Respecto a las variantes virales en México, se llevó a cabo un estudio de casos y controles en el cual se analizaron las secuencias de los genes E6 y L1 de HPV16, obteniendo como resultados que en los casos con cáncer, 23% pertenecen a las

variantes AA y 27% a variantes E, mientras que en el grupo control sólo el 1% pertenecía a variantes AA y 10% a variantes E. En general, las muestras con variantes AA se encontraron tanto en pacientes con cáncer escamoso como en adenocarcinomas, mientras que la variante E solo en cáncer escamoso (Berumen y cols 2001). Lizano y colaboradores (2006) determinaron que variante AA subtipo c de VPH16 sólo se presentaba en CaCu, mientras que la variante E de VPH18 presentaba alta prevalencia en CaCu. En contraste un estudio realizado en San Luis Potosí reportó 94% de variantes E en LIEBG, LIAG y CaCu, siendo la variante A334G la de mayor frecuencia. Los resultados de estos estudios demuestran diferencias en la distribución de variantes geográficas de VPH (Ho y colaboradores, 1993).

Prevención del CaCu

En la actualidad la implementación de estrategias para prevenir el CaCu se enfoca en dos aspectos: la prevención primaria basada en la vacunación y la prevención secundaria basada en la detección molecular de VPH.

La vacuna contra VPH sólo protege contra la infección de 4 tipos virales (Gardasil, Merck), dos de alto riesgo 16 y 18 que juntos representan el 70% de los casos de CaCu y dos de bajo riesgo 6 y 11 causantes del 90% de las verrugas genitales externas (Juárez y Juárez, 2008). Adicional a esto, existen reportes donde se identifica protección cruzada para los tipos virales VPH31 y 45 (Kemp y cols, 2011). Por su parte, Meijer (2000) recomienda además de la prueba de PAP, realizar la detección molecular de VPH en mujeres mayores de 35 años, a fin de lograr una reducción significativa del CaCu en América Latina.

Detección molecular de VPH

Esta evita errores de diagnóstico por apreciaciones subjetivas (Wright, 2007). Debido a la relación entre el riesgo de progresión a cáncer con el tipo viral, es de gran importancia realizar la genotipificación, estado de integración del ADN viral y expresión de sus genes para mejorar la efectividad en la prevención de CaCu (Gaelle y cols, 2008). Existen diferentes métodos moleculares para la detección de VPH tales como: a) captura de híbridos (*digene* Hybrid Capture 2 High-Risk), que es capaz de detectar VPH de alto riesgo, aunque no permite identificar el tipo viral está presente, b) HPV DNA Test que detecta 13 tipos virales de alto riesgo, c) Linear Array ROCHE capaz de detectar 37 tipos virales de los cuales 15 son de alto riesgo, e) Amplicor (COBAS), detecta la presencia de tipos virales de alto riesgo, f) Inmunohistoquímica, para identificar la proteína p16, la cual es producto del gen p16INK4 un inhibidor de cinasas de pendiente de ciclínas cuya sobre expresión se ha relacionado con la presencia de pRB disfuncional por la unión de VPH16 E7.

En la actualidad uno de los métodos más utilizados es PCR y secuenciación, ya que esto permite determinar el tipo viral además de tener una sensibilidad del 99.5% y especificidad del 97.5% (Gutiérrez y col, 2009) mientras que los métodos por hibridación, permiten identificar más de un tipo viral presente en la muestra pero por desgracia este no diferencia si el virus se encuentra de manera activa (Gutiérrez y colaboradores, 2009).

Respecto a la detección por PCR se utilizan oligonucleótidos (cebadores), específicos para la detección de VPH de alto y bajo riesgo llamados GP5+/GP6+ (permiten detectar 23 tipos virales) y MY11/MY09 (detectan más de 23 tipos), ambos juegos de cebadores amplifican una región de la secuencia del gen L1 de donde se obtiene la secuencia específica de cada tipo viral (Gravitt y cols, 2000; Coutlée y cols, 2002). Sin embargo, este método de detección a pesar de ser altamente específico no permite identificar múltiples infecciones virales en una

misma paciente (Weimin y cols, 1997). Se ha demostrado que ambos juegos de cebadores usados en conjunto mejoran la sensibilidad de detección disminuyendo los falsos negativos e incluso realizando experimentos con PCR anidada o parcialmente anidada se han podido identificar una mayor variedad de tipos virales (Lee y cols, 2007 y 2009), mientras que otros autores plantean que los cebadores llamados MY detectan mayor número de tipos virales (Francois y cols, 2002).

Tabla 1. Comparación de métodos para la detección de VPH, Tomado de, *Gutiérrez y colaboradores, 2009*

Comparación entre diferentes pruebas de detección de VPH					
Prueba	Detecta	Uso	Sensibilidad	Especificidad	Lesiones asociadas
<i>Papanicolaou</i>	Células anormales	Posibles lesiones cervicales	50-84%	91.25%	Posible lesión cervical
<i>Colposcopia</i>	Neoplasia cervical	Lesión cervical	95%	63.75%	Lesión cervical
<i>Virpap/Vira type</i>	ADN de VPH	Detección de 7 tipos de VPH	79%	79%	Cáncer invasivo NIC III
<i>PCR-R restricción</i>	ADN de VPH	Detección y genotipificación	99.5%	97.5%	Cáncer cervical
<i>Captura de Híbridos I</i>	ADN de VPH	Detección de 9 tipos virales de alto riesgo y 5 de bajo riesgo	71.2%	88.9%	HSIL
<i>Captura de Híbridos II</i>	ADN de VPH	Detección de 13 tipos virales de alto riesgo y 5 de bajo riesgo	1000 copias de ADN viral ó 0.2-1pg de ADN de VPH >96%	66.7%	Depende de la carga viral HSIL (NIC II y III)
<i>INNO-*LIPA detección y ensayo de genotipificación</i>	ADN de VPH	Detección y genotipificación de 25 tipos virales de bajo y alto riesgo y B globulina	98.4% media – severa discarías	79.4%	Prevalencia de VPH
<i>Reverse-Line blot</i>	ADN de VPH	Detección y genotipificación de 27 tipos virales de alto y bajo riesgo y B-globulina	10-100 copias / PCR	Baja reactividad cruzada entre tipos	Prevalencia de VPH
<i>Prueba AMPLICOR VPH</i>	ADN de VPH	Detección de 13 tipos virales de alto y bajo riesgo y B-globulina	100 copias/ PCR de tipos de alto riesgo 95.2%	No reactividad cruzada entre tipos de bajo y alto riesgo 96.7%	Prevalencia de VPH aumenta junto con la severidad de la lesión. NIC II-III y HSIL
<i>Linear Array VPH</i>	ADN de VPH	Detección y genotipificación de 37 tipos anogenitales	Aun en pruebas		Infecciones múltiples
<i>COBAS TaqMan VPH</i>	ADN de VPH	Alto riesgo y carga viral	Aun en pruebas		Prueba de tamizaje
<i>*ELISA-*VLP-16</i>	Neutralizando anticuerpos	Exposición a VPH	53%	97%	Cáncer cervical
<i>ELISA-Early proteins</i>	Anticuerpos para E4 y E7	Marcadores serológicos de ciclo viral y progresión de lesiones	67%	78%	Anti E4: LSIL Anti E7: cáncer cervical y mal pronóstico

*LiPA. Line Probe Assay. *ELISA. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay. *VLP. Virus Like Particles

Prevención oportuna de CaCu

En México se cuenta con la Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del CaCu, que consiste básicamente en la prueba del PAP y se recomienda de la detección molecular de VPH pero dicha recomendación no se estipula como responsabilidad de las instituciones de salud. Sin embargo existen problemas de diversa índole que no han permitido disminuir los altos índices de morbi-mortalidad del CaCu de forma significativa, entre los cuales se encuentran: factores económicos, culturales y sociales. Por último, la falta de infraestructura, personal capacitado y falta de fondos de financiamiento hacen aún más difícil el manejo de esta enfermedad en países en vías de desarrollo (Cronje, 2004). A nivel mundial, se plantea como estrategia de prevención del CaCu que mujeres con estudio de PAP con diagnóstico normal, deberá realizarse la prueba de VPH por captura de híbridos (HC) en pacientes mayores a 25 años de edad (Programa de Acción: Cáncer cérvico uterino), si esta es negativa entonces dicho examen deberá realizarse dentro de 2 a 3 años posteriores, pero si este resultado es positivo deberán repetir la citología y la prueba de VPH dentro de los próximos 6 y 12 meses. Mientras tanto en México, si el resultado de PAP es considerado como normal en dos ocasiones consecutivas se recomienda realizar la siguiente prueba una vez transcurridos 36 meses (figura 8).

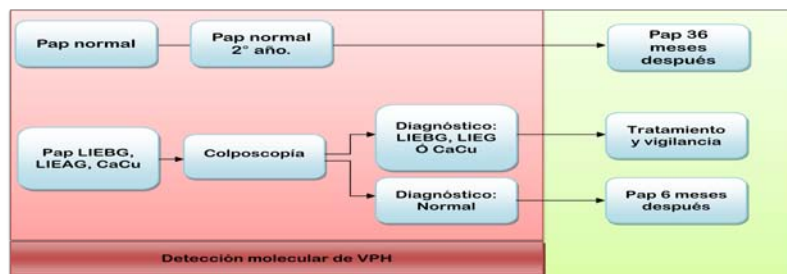


Figura 8. Algoritmo de tratamiento en base al informe de citología con prueba de PAP y VPH según el programa de acción: Cáncer cérvico uterino basado en la NOM-014-SSA2 modificada en 2006. Como apoyo a la detección oportuna de CaCu adicional a la prueba de Pap. Se recomienda si es que las pacientes pueden tener acceso a la prueba de detección de VPH.

Justificación

Debido a la baja especificidad y sensibilidad en el diagnóstico de lesiones precursoras de CaCu mediante la prueba de PAP, se ha propuesto a la detección molecular de VPH como estrategia auxiliar para la prevención de CaCu. Sin embargo, la implementación de pruebas moleculares no se han establecido como métodos de rutina en nuestro país, por lo que en el presente estudio se plantea realizar la detección molecular del VPH en citologías cérvicovaginales en un grupo de mujeres que acuden al Programa de Detección Oportuna del Cáncer (PDOC), con la finalidad identificar aquellas pacientes que estén infectas por el agente etiológico de CaCu.

Objetivo general.

Identificar los tipos de VPH en citologías cérvico-vaginales de pacientes que acuden al PDOC.

Objetivos particulares.

- ❖ Determinar la frecuencia de infección de VPH de alto y bajo riesgo en pacientes que acuden al PDOC.
- ❖ Identificar los tipos virales de mayor frecuencia y su asociación con el diagnóstico citopatológico.
- ❖ Identificar los cambios de secuencia de los VPH presentes.

Materiales y métodos

Figura 9. Representación de la metodología seguida durante el trabajo. La prueba de PAP se realizó de manera rutinaria en las clínicas correspondientes de las pacientes al igual que el diagnóstico citopatológico.

Material biológico

Se obtuvieron 352 muestras de cérvix por citología exfoliativa de mujeres que acuden PDOC realizarse la prueba de PAP en clínicas de primer nivel de atención, del Distrito Federal durante el periodo 2009 y 2010. Previo a la toma de muestra las pacientes firmaron carta de consentimiento informado para el ingreso de su muestra al presente trabajo de investigación, además de llenar una hoja de

datos clínicos para su posterior análisis. Se tomó las muestras para PAP de manera rutinaria por medio de extendido en lamilla y fijado en el momento para su diagnóstico de PAP. Las células remanentes en el cepillo cervical, las cuales representan aproximadamente 80%, fueron fijadas y almacenadas a 4°C para su posterior procesamiento en laboratorio.

Extracción de ADN

Posterior a la obtención de muestras se realizó la extracción de ADN utilizando el kit Wizard DNA Purification (Promega, USA), para corroborar la integridad del ADN se resolvió en gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio, posteriormente el ADN se cuantificó por medio del espectrofotómetro Nanodrop (N-1000 V3).

Detección de VPH por PCR

Se realizó PCR usando como los cebadores GP5+F, TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC, GP6+R GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C que amplifican 141pb del gene L1, siguientes condiciones: Taq buffer 1X, MgCl 2nM , dNTPs 0.2nM, GP+5/6 25pMol, Taq DNA pol 1 unidad por reacción en las siguientes condiciones: 94°C 5min, 40 ciclos de 94°C 40 s, 44°C 60 s, 72°C 40 s y extensión final de 72°C 5 min. Se utilizaron los cebadores MY11 GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG, MY09 CGT CCM ARR GGA WAC TGT TAT C que amplifican 451pb del gen L1. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25µl con 1nM de cada cebador, 3.5nM de MgCl, Taq buffer 1x, 1U de Taq DNA polimerasa marca. Las condiciones de ciclado para MY11/09, 94°C 5 min, seguido por 40 ciclos de 94°C 30 s, 55°C 50 s y 72°C 60 s con una extensión final de 72° 5 min. Finalmente se realizó la PCR con los cebadores GP6+/MY11 (183pb) utilizando; Taq buffer 1X, MgCl 3mM, dNTPs 0.3nM, GP6+/MY11 pM, Taq DNA polimerasa 1 unidad por reacción en un volumen final de 25ul, con las condiciones de ciclado: 94°C 10 min, 30 ciclos de 94°C 30 min, 47.5°C 30 seg, 71°C 60 seg y 72°C 5 minutos. Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo C1000 Thermal Cycler (BIO RAD, USA C1000). Como control positivo se utilizó la línea celular Hela

infectada por el VPH tipo 18. En la figura 10 se muestra la secuencia del gen L1 y la zona que amplifica cada juego de cebadores.

Figura 10. Región amplificada por cada juego de cebadores.

Secuenciación

En las muestras positivas se purificaron las bandas correspondientes al producto de amplificación de 451pb (MY11/09) y 141pb (GP+5/6) del gel de agarosa al 1.5%, mediante el uso de columnas Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA, USA), para posteriormente ser marcadas para secuenciación por medio del kit Big Dye Terminator v3.1 y secuenciadas en el equipo ABI PRISM 3100 bajo las condiciones indicadas por el fabricante. Las secuencias se analizaron con el programa MEGA 4 para ser alineadas con la herramienta y base de datos Basic Logic Alignment Search Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para poder identificar el tipo viral.

Análisis de secuencias

Una vez obtenidas las secuencias estas se editaron con el programa MEGA 4 (Tamura, Dodley, Nei y Kumar 2007) corroborando que no existieran errores de lectura en cada electroferograma. Para determinar el tipo viral estas secuencias se alinearon con la herramienta Blast en PubMed (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Posteriormente se realizó el alineamiento de las secuencias de proteínas obtenidas con las referencias con el programa tblastn para identificar si existían cambios en la secuencia de aminoácidos de la región de proteína L1, de acuerdo a la secuencia de referencia de cada tipo viral previamente determinado.

RESULTADOS

Se obtuvieron 352 citologías exfoliativas con sus respectivos cuestionarios y formato de consentimiento informado, de los cuales fueron que 31.7% de las pacientes utilizaron métodos anticonceptivos hormonales, 28.3% indicaron el consumo de cigarro de manera cotidiana, 13.7% respondieron haber consumido bebidas alcohólicas, 39% de las pacientes dijeron tener antecedentes de algún familiar con cáncer siendo la madre el familiar más común con este padecimiento y cuando se les cuestionó sobre el resultado de su último Pap. 48.4% dijeron haber tenido resultado normal (Tablas 2 y 3)

Tabla 2. Datos clínicos obtenidos de las pacientes.

		Porcentaje (%)	N
Método anticonceptivo	Ninguno	30.3	351
	Hormonal	31.7	
	Condón	3.1	
	DIU	17.9	
	Histerectomía	6	
	Otro	10.5	
Consumo de cigarro	Si	28.3	351
	No	71.7	
Tiempo de consumo	Casual	69.9	168
	0 – 7 años	6.6	
	>8 años	23.8	
Consumo de bebidas alcohólicas	Si	13.7	351
	No	86.3	
Antecedente familiar con cáncer	Si	39	351
	No	61	
Parentesco	Madre	12.2	352
	Padre	4.3	
	Hermano/Hermana	5.7	
	Tío/Tía	7.7	
	Primo/Prima	2.0	
	Abuelos/Abuelas	7.1	
	Ninguno	61.1	
Resultado de último Pap.	Infección por bacterias y/u hongos	17.0	351
	Inflamación	14.0	
	Lesión precursora	1.7	
	VPH	8.0	
	No sabe	9.4	
	Cacu	1.4	
	Normal	48.4	

Tabla 3. Promedio de datos clínicos.

	Media	D.E. (\pm)	N
Edad	47	13.51	342
No. De embarazos	3	2	346
Inicio de vida sexual	20	5.3	343
No. de parejas sexuales	2	2	350
Edad de primera visita al ginecólogo	17	16	351

Detección de VPH

Se identificaron 14 (4%) muestras positivas a VPH con los cebadores GP5+/GP6+, 16 (4.5%) casos positivos con los cebadores MY11/09 y 36 (10.23%) con la combinación GP6+/MY11 dando como resultado final 36 muestras positivas a VPH, de este modo el porcentaje de detección de VPH incrementó de 4.5% a 10.23% por la combinación de los cebadores GP6+/MY11 (Tabla 4).

Tabla 4. Detección de VPH con distintos juegos de iniciadores.

Cebadores	GP5+/GP6-	MY11/MY09	MY11/GP6+
Número de casos positivos	14	16	36
Tipos virales	16, 18, 35, 45, 53, 70, 81 y múltiples infecciones	16, 18, 35, 45, 62, 67 y 81	16, 18, 35, 84, 31, 45, 52, 53, 61, 62, 67, 70, 81 y múltiples infecciones

Con la combinación MY11/GP6+, se incrementó el número de casos positivos para VPH.

Una vez identificados los casos positivos, las muestras se secuenciaron, obteniendo 26 secuencias (Figura 11a), es decir 72% de los casos resultaron positivos a VPH. En las restantes 10 muestras (28%) no se logró identificar el tipo viral debido a que en los electroferogramas obtenidos se presentaban secuencias sobrelapadas, debido a la presencia de más de un tipo viral en cada muestra (Figura 11b), por lo que mediante el método de secuenciación no se logró definir el tipo viral de estas 10 muestras.

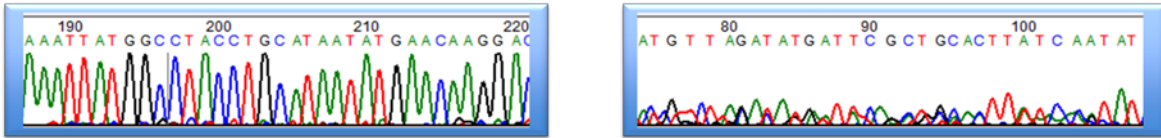


Figura 12. A). Electroferograma para obtener secuencia de VPH, la secuencia se puede apreciar claramente. B). Electroferograma con secuencias sobrelapadas, no permiten identificar una secuencia para su alineamiento y tipificación viral.

Tomando en cuenta sólo aquellos casos en los que se logró determinar el tipo viral (26 muestras) se identificaron 13 diferentes tipos; 16 (15%), 18 (19%), 31 (4%), 35(12%), 45 (4%), 52 (8%), 53 (4%), 61 (8%), 62 (4%), 67 (4%), 70 (8%), 81(4%) y 84 (8%). Según la clasificación oncogénica dada por Muñoz y colaboradores en 2003, 62% de los casos fueron de alto riesgo oncogénico (AR), 4% probable alto riesgo (PAR), 19% bajo riesgo (BR) y 15% restante con riesgo aun no determinado (RND). Los tipos virales con mayor porcentaje fueron los asociados AR y PAR, juntos suman el 66%, mientras que el restante 34% fue de los tipos virales de BR y RND (Figura 12).

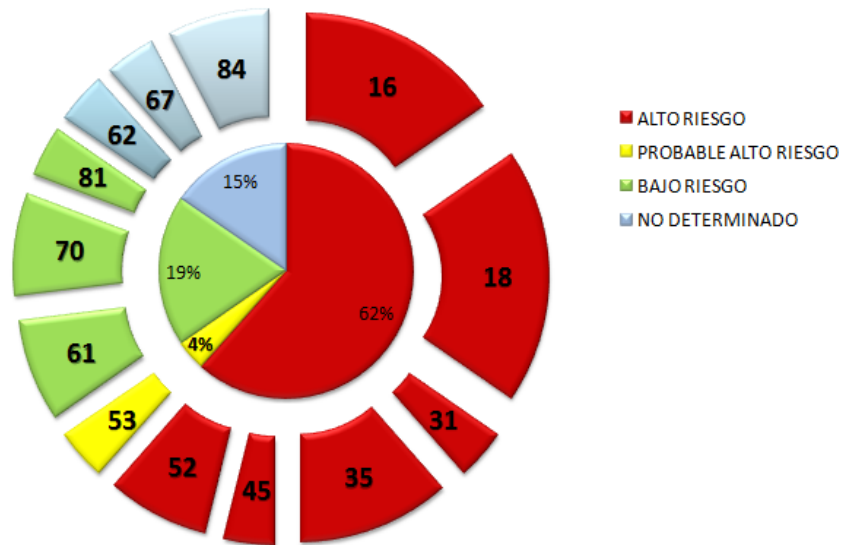


Figura 12. Porcentaje de VPH de acuerdo a su clasificación de oncogénica. Los principales tipos virales de alto riesgo son VPH16, 18 y 35. Estos datos se basan en las 26 muestras que pudieron ser tipificadas por secuenciación.

El rango de edad de las pacientes con resultado negativo a VPH fue de 16 a 80 años, la media fue 48 y el 50% de estas pacientes se encuentra en el rango de 48-56. La edad de las pacientes infectadas con VPH AR fue de 20-60, la media de 38 y 75% están por debajo de los 38 años. En pacientes infectadas con VPH BR las edades van desde los 22-62, la media es de 44 y el 75% de las pacientes están por debajo de los 42. En el caso de las pacientes infectadas con VPH de PAR, el 100% se encuentran en los 40 años. Las pacientes infectadas con tipos virales de RND se encuentran en el rango de de 47-51, la media es de 50 años y el 50% de las pacientes tienen entre 48 y 51 años. En pacientes infectadas por VPH pero con resultado de tipo viral no identificado (TNI) las edades van desde los 30 hasta los 68, la media es de 51 y el 75% de las pacientes están entre los 51-67 años (Figura 13).

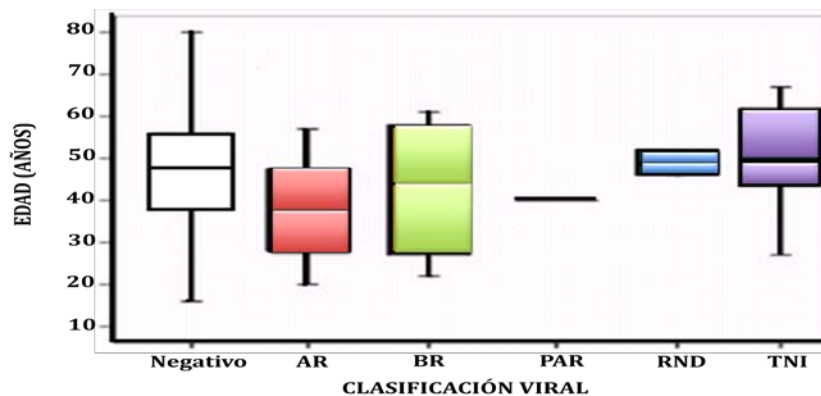


Figura 13. Rangos de edad en los que se encuentran los tipos virales de acuerdo a su clasificación oncogénica. TNI=Tipo viral No Identificado por secuenciación, este grupo de pacientes presentaron coinfecciones.

De manera más específica en la figura 14 se pueden observar los porcentajes de infección de acuerdo a los rangos de edad, donde la infección por Papiloma AR es más frecuente conforme aumenta la edad de las pacientes, la infección por BR se presenta principalmente en los rangos ≤ 24 y 49 – 60 años de edad.

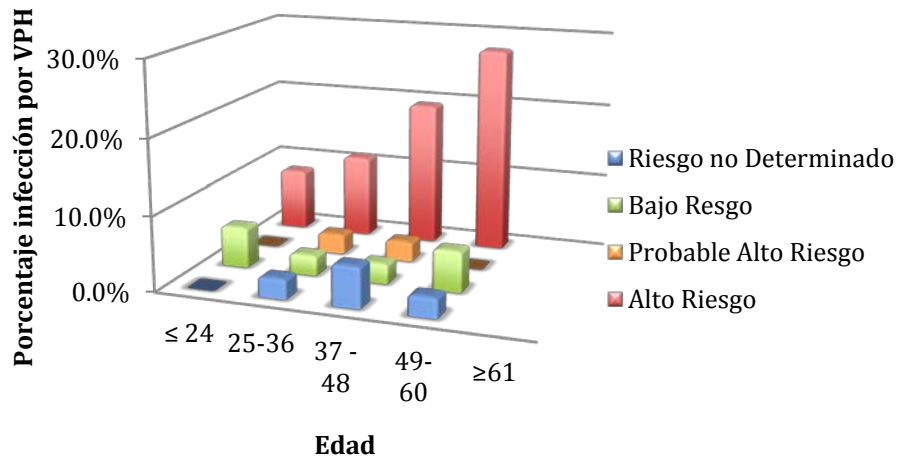


Figura 14. Frecuencia de infección por VPH de acuerdo a edad.

En la figura 15 se puede apreciar que en las muestras con tipo viral no identificado por secuenciación, el número de partos va desde 0 hasta 7, la media es de 3, mientras que el 75% de las pacientes tuvieron de 3 a 7 partos y sólo una paciente con tipo viral no identificado tuvo 19 partos.

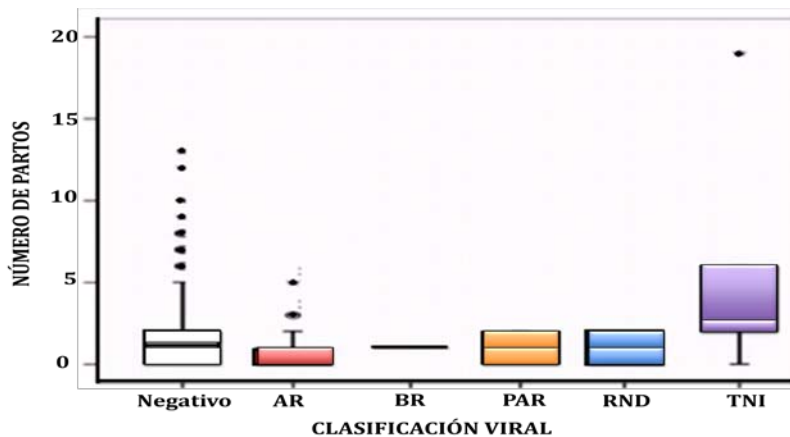


Figura 15. Número de partos de acuerdo a la clasificación oncogénica de las muestras infectadas con VPH.

* = datos fuera de las distribución normal de cada grupo)

Detección de coinfecciones

Como se explicó previamente, la secuenciación no permite la identificación de infecciones múltiples por VPH. Por lo tanto se empleó la prueba Linear Array *Genotyping Test* de ROCHE™, la cual consiste en la genotipificación de hasta 37 tipos virales presentes en una muestra mediante PCR e hibridación reversa en línea, además de incorporar como control positivo b-globina dentro del mismo ensayo. Fue así como las 10 muestras no tipificadas por secuenciación, más una muestra previamente identificada con VPH16, se procesaron según las instrucciones dadas por el proveedor para esta prueba de genotipificación.

En la figura 16 se muestran ejemplos de los resultados obtenidos por la prueba de Linear Array. Como se esperaba, se detectaron infecciones múltiples por VPH, donde las muestras presentaron infección de 2 a 10 tipos distintos por muestra. En total se detectaron 17 Papilomas distintos; VPH16, 18, 35, 45, 51, 53, 55, 56, 61, 62, 66, 67, 69, 70, 71, 82, y 84. De estos 53% fueron de AR, 6% PAR, 6% BR y 35% RND, los tipos virales más frecuentes fueron VPH 51 y 62 (figura 17). LA muestra previamente tipificada por secuenciación mostro el mismo resultado, VPH16.

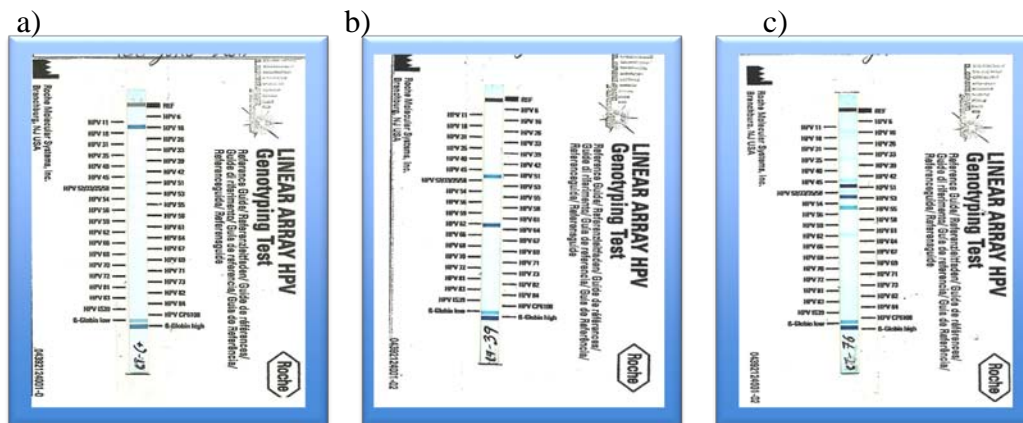


Figura 16. Resultado de Linear Array de muestras que no se logró determinar el tipo viral por el método de secuenciación debido a infección múltiple de VPH. a) Muestra positiva para VPH16 previamente por secuenciación, b) muestra positiva para VPH 51 y 62, c) muestra positiva a VPH con 8 tipos virales (16, 18, 35, 45, 51, 53, 55 y 62).

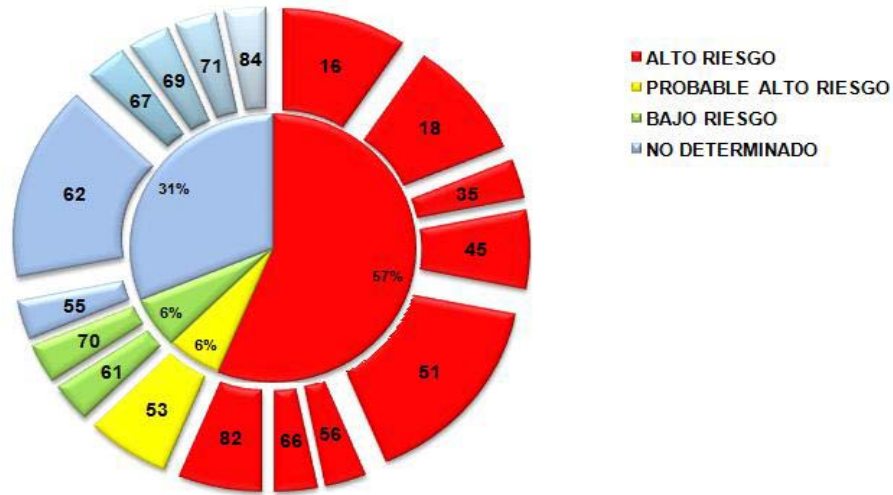


Figura 17. Porcentaje de VPH detectados por Linear Array de acuerdo a su clasificación oncogénica. Los tipos virales de alto y probable alto riesgo en conjunto suman más el 60% de los tipos virales presentes en las infecciones múltiples de VPH y con el 31% los tipos virales de riesgo aun no determinado.

Tabla 5. Tipos virales presentes en las muestras con infección múltiple detectada por la técnica de Linear Array HPV Genotyping

Muestra	Tipo viral																	No. TOTAL DE VPH
	16	18	35	45	51	53	55	56	61	62	66	67	69	70	71	82	84	
CT-76	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x						x		10
CT-175	x															x		2
CT-188				x								x						2
CT-204	x				x						x						x	4
CT-298						x				x							x	3
CT-306					x								x					2
CT-250		x								x								2
CT-135			x		x													2
CT-348		x								x				x				3
CT-39					x					x								2
CT-248	x																	1
TOTAL	3	3	2	3	5	2	1	1	1	5	1	1	1	1	1	2	1	

Tipos virales AR (rojo), PAR (amarillo), BR (verde) y RND (azul).

Relación Diagnóstico citopatológico y VPH

Se obtuvo el diagnóstico citopatológico de las 352 muestras, de las cuales el 88.3% se diagnosticaron como normales ó inflamación, 9.3% LIEBG, 0.28% toma inadecuada y 1.98% positivas a infección por VPH. La correlación entre diagnóstico citopatológico y la detección molecular de VPH fue, 9.64%, 12.12% y 28.5% en muestras con diagnóstico citopatológico normal, LIEBG y VPH respectivamente (tabla 6).

Tabla 6. Correlación entre diagnóstico citopatológico y detección molecular por VPH.

DIAGNÓSTICO De PAP	n	+VPH PCR y L.A.	Coinfección	Alto Riesgo	Probable Alto Riesgo	Bajo Riesgo	Riesgo no determinado
Normal / Inflamación	311	30/311 9.64%	9/30 30%	10/30 33.3%	1/30 3.3%	4/30 13.3%	6/30 20%
LIEBG	33	4/33 12.12%	0	2/4 50%	0	0	2/4 50%
Toma inadecuada	1	0/1 0	0	0	0	0	0
VPH	7	2/7 28.5%	1/2 50%	1/2 50%	0	0	
Total	352	36	10	13	1	4	8

Análisis de secuencias

Se obtuvieron 26 secuencias de las cuales se logró determinar el tipo viral comparando las secuencias obtenidas con las respectivas referencias del gen L1 de VPH para cada tipo viral previamente reportadas en NCBI. Ninguno de los cambios encontrados en las secuencias analizadas ha sido previamente reportado. En el caso de HPV16 solo una muestra presentó un cambio en el nucleótido 6639C>T lo cual no provocó cambio en la secuencia de aminoácidos. Para VPH18 solo una muestra presentó un cambio no sinónimo 6627C>T:P339R. En tres muestras se detectó el cambio 6731G>A. VPH61 6682A>T:E361V. HPV61 6929C>A, 6947G>T, 6949G>A y 6952A>G:V371L (figura 18a). VPH52 dos muestras presentaron los mismos cambios tanto en secuencia de ADN como

de aminoácidos 6712G>A:S383N (figura 18b) y 6722A>T:K386N y en el caso de la muestra CT238 6773A>G. VPH62 6937C>T y 7159C>T. VPH67 6731G>A y 6740A>T. VPH70 6633G>A, 6741T>A, 6801A>C, 6873A>G presentando solo un cambio en la secuencia de aminoácidos en el cambio de la secuencia de ADN 6886A>G:T434A. VPH84 las dos muestras con este tipo viral presentan el cambio 6719A>C:N352T.

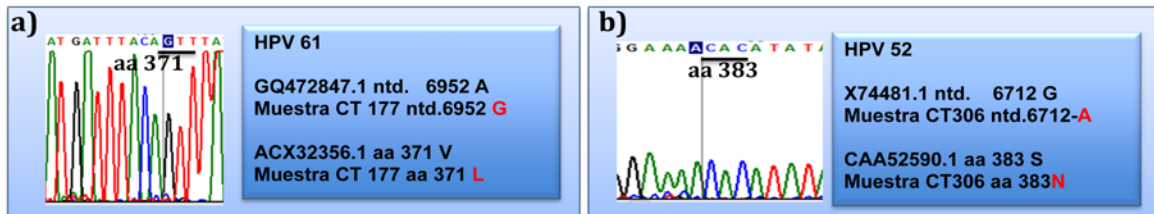


Figura 18. Cambio en la secuencia de (a) VPH61 y (b) 52.

Discusión

Previamente se había reportado la prevalencia de VPH en muestras normales de exfoliaciones cervicales desde 6 hasta 12% (Lazcano, 2001; Piña 2006; 2010; Velázquez 2009; Lazcano 2010) mientras que en el presente estudio se detectó el 10.3%, de las cuales, la mayoría de las infecciones fueron causadas por tipo virales de alto riesgo tal como se ha reportado en otros estudios previos en México (Lazcano y colaboradores, 2001; Piña 2006, Aguirre, 2007; 2010; Velázquez 2009) donde la mayor cantidad de infecciones se encuentra en mujeres menores de 30 años y mayores a 50 años de edad (Lazcano y colaboradores, 2001; 2010).

Debido a que el 62% de tipos virales encontrados en las muestras estudiadas son de alto riesgo oncogénico, es sumamente importante que las pacientes infectadas con estos tipos virales mantengan el debido seguimiento de la infección para prevenir el desarrollo de lesiones precursoras, realizando visitas al ginecólogo a los seis meses de la detección y de esta manera mantener vigiladas a las pacientes que han estado en contacto con este agente etiológico del cáncer. Cabe señalar que los dos principales tipos virales de alto riesgo (34%) fueron VPH16 y 18 tal y como se ha reportado previamente (Lazcano y colaboradores, 2001; 2010; Piña 2006; Aguirre, 2007), sin embargo VPH 35 con el 12% también es un tipo viral de alto riesgo, que sobresale entre los demás tipos virales encontrados en el estudio además de haber sido reportado previamente en infecciones múltiples por VPH (Correa y colaboradores, 2011). Esto deja en evidencia la necesidad de realizar más estudios donde se realice la tipificación viral para poder dirigir una estrategia de prevención tal y como es la vacunación hacia los tipos virales que afectan a cada población, ya que las vacunas comerciales y de distribución pública están dirigidas a los tipos virales 16 y 18 de alto riesgo y, a VPH 6 y 11 de bajo riesgo, ya que estos tipos virales son los más comunes en la población mundial; sin embargo no necesariamente en poblaciones específicas, como lo fue en este estudio, donde, ninguna de las

muestras positivas a VPH presentaron infección por VPH6 ó VPH11, a pesar de ser los más comunes causantes de verrugas genitales (Heinzel y colaboradores, 1995).

En el afán de desarrollar un método más sensible para la detección de VPH, a la fecha se han diseñado cebadores que permiten generar amplificadores para realizar la detección de solo algunos tipos virales, la combinación de dos cebadores GP+6/MY11 ayudo a detectar el 60% de los casos positivos en las muestras del estudio incrementando la sensibilidad de la detección por PCR (Lee y colaboradores, 2007; 2009), lo cual hace ver que incluso realizando la detección molecular de VPH por la tipificación estándar (secuenciación), existen las múltiples infecciones é incluso tipos virales que no pueden ser flanqueados por los cebadores diseñados hasta la fecha.

Por otra parte en una infección como la de Papiloma, existen factores tales como subtipos y variantes geográficas que pueden llegar a tener implicaciones clínicas en el desarrollo de la infección, por tal motivo se obtuvo la secuencia de ADN para cada caso. Ninguna secuencia obtenida pertenecía a alguna variante previamente reportada, sin embargo diferentes muestras con el mismo tipo viral presentan los mismos cambios en la secuencia de nucleótidos del gen L1 de VPH 52 y 84 que generan cambios en las secuencias de aminoácidos, lo cual podría ser relevante debido a que VPH 52 es considerado de alto riesgo, dando mayor peso a estudios como este en el que se busca conocer la secuencia específica de cada tipo viral y de tal modo obtener datos para su posterior análisis y ayuda para el diseño de estrategias de prevención.

El método de detección utilizado para realizar la detección y tipificación viral fue lo suficientemente sensible para detectar los casos positivos de VPH pero no resultó adecuado para determinar los tipos virales en aquellas muestras con más de un tipo de VPH. Por tal motivo es necesario utilizar otros métodos como Linear Array que permitan la genotipificación de coinfecciones.

Con los resultados obtenidos por la técnica de Linear Array, se observó que la diversidad de virus presentes en solo 10 muestras es mayor a la diversidad de tipos encontrados en las muestras (n=26) con un solo tipo de Papiloma. Las infecciones múltiples se presentaron en una tercera parte de las infecciones, mientras que otros estudios han reportado hasta 43% (Chaturvedi y colaboradores, 2011). Adicionalmente, algunos de los tipos virales de alto riesgo presentes en las infecciones múltiples no se detectaron en las muestras con un solo tipo viral. Las posibles implicaciones clínicas que podría causar una infección múltiple aun no se tienen claras, sin embargo la genotipificación en pacientes infectadas con uno o más VPH es importante para determinar el impacto en el riesgo a desarrollar lesiones precursoras y cáncer, además de contribuir con el desarrollo de vacunas tipo específicas (Oliveira y colaboradores, 2010).

Tomado en cuenta el diagnóstico la prueba de PAP, en la mayoría de los casos la infección por VPH no pudo ser identificada, probablemente por la falta de alteraciones citológicas, sin embargo, haciendo uso de herramientas moleculares para la detección de VPH se puede ayudar a la prevención del CaCu (Nauclear y colaboradores, 2009), ya que tanto en las coinfecciones como las infecciones únicas, los VPH de alto riesgo fueron los de mayor prevalencia.

Conclusión

La mayoría de los tipos de VPH detectados son de alto riesgo, aún cuando no se detectaron alteraciones citológicas tanto en mujeres que presentan un tipo viral como en aquellas con coinfecciones; por lo cual el uso de herramientas moleculares debe incorporarse para mejorar la prevención de lesiones precursoras y CaCu, y a su vez, disminuir la incidencia y mortalidad por esta enfermedad. También es necesario desarrollar técnicas y metodologías que nos permitan conocer el comportamiento biológico y desarrollo clínico de la infección por VPH.

REFERENCIAS

AGUIRRE HR, MEDINA CL, MONTOYA FH, SANDOVAL LJG, PADILLA RM, GARCÍA SV, JÁUREGUI MA. 2007. FACTORES RELACIONADOS CON EL CÁNCER CERVICOUTERINO EN EL ESTADO DE NAYARIT, MÉXICO. GINECOL OBSTET MEX 75:311-6

APIOU F, FLAGIELLO D, CILLO C, MALFOY B, POUPON MF, DUTRILLAUS B. 1996. FINE MAPPING OF HUMAN HOX GENE CLUSTERS. CYTOGENET CELL GENET. 73:114–5.

BERUMEN J., ORDOÑEZ R., LAZCANO E., SALMERON J., GALVAN S., ESTRADA R., YUNES E., GARCIA A., GONZALEZ G., MADRIGAL A. 2001. ASIAN-AMERICAN VARIANTS OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS 16 AND RISK FOR CERVICAL CANCER: A CASE–CONTROL STUDY. JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE.

BOSCH FX, MANOS MM, MUÑOZ N, SHERMAN M, JANSEN AM, PETO J, SCHIFFMAN MH, MORENO V, KURMAN R, SHAH KV, INTERNATIONAL BIOLOGICAL STUDY OF CERVICAL CANCER (IBSCC) STUDY GROUP 1995. PREVALENCE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN CERVICAL CANCER: A WORLDWIDE PERSPECTIVE. J NATL CANCER INST 87: 796-802.

CAROLINE AJ., HORVATH GAELLE AV., BOULET VIRGINIE M RENOUX, PHILIPPE O DELVENNE, JOHN-PAUL J BOGERS. 2010. MECHANISMS OF CELL ENTRY BY HUMAN PAPILLOMAVIRUSES: AN OVERVIEW VIROLOGY JOURNAL, 7:11

CHAN S. Y., S. H. CHEW, K. EGAWA, E. I. GRUSSENDORF-CONEN, Y. HONDA, A. RUEBBEN, K. C. TAN, AND H. U. BERNARD. 1997. PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 2 (HPV-2), HPV-27, AND HPV-57 GROUP, WHICH IS ASSOCIATED WITH COMMON WARTS. VIROLOGY 239:296–302.

CHATURVEDI A., KATKI H., HILDESHEIM A., RODRÍGUEZ A., QUINT W., SCHIFFMAN M., VAN DOORN L., PORRAS C., WACHOLDER S., GONZALEZ P., SHERMAN M., HERRERO R. 2011. HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION WITH MULTIPLE TYPES: PATTERN OF COINFECTION AND RISK OF CERVICAL DISEASE. J INFECT DIS; 203(7):910-20.

CHRIS J.L.M. MEIJER, PETER J.F. SNIJDERS, ADRIAAN J.C. VAN DEN BRULESCREENING FOR CERVICAL CANCER: SHOULD WE TEST FOR INFECTION WITH HIGH-RISK HPV? CMAJ • SEPT. 5, 2000; 163 (5)

CONRAD M, BUBB VJ, SCHLEGEL R.1993. THE HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 6 AND 16 E5 PROTEINS ARE MEMBRANE-ASSOCIATED PROTEINS WHICH ASSOCIATE WITH THE 16- KILODALTON PORE-FORMING PROTEIN. JOURNAL OF VIROLOGY. 67:6170–8.

CORRÊA C., TEIXEIRA N., ARAÚJO A., CARVALHO N., CASTILLO D., CAMPOS R., OLIVEIRA I., ALVES A., FRANÇA A., MELO V. 2011. PREVALENCE AND MULTIPLICITY OF HPV IN HIV WOMEN IN MINAS GERAIS, BRAZIL. REV ASSOC MED BRAS; 57(4):425-30.

COUtlÉE F, GRAVITT P, KORNEGAY J, HANKINS C, RICHARDSON H, LAPOINTE N, VOYER H. THE CANADIAN WOMEN'S HIV STUDY GROUP, FRANCO E. 2002. USE OF PGMV PRIMERS IN L1 CONSENSUS PCR IMPROVES DETECTION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS DNA IN GENITAL SAMPLES. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 902–907

DIMAIO D, MATTOON D. 2001. MECHANISMS OF CELL TRANSFORMATION BY PAPILLOMAVIRUS E5 PROTEINS. ONCOGEN. 20:7866–73.

DIRECCIÓN DE ESTADÍSTICA, INFORMÁTICA Y EVALUACIÓN. ESTADÍSTICAS DE MORTALIDAD EN MÉXICO, 1994. MÉXICO: D.F.: SECRETARÍA DE SALUD, 1995.

DOLL P, IZPISTIA BJC, BROWN JM, TICKLE C, DUBOULE D. 1991. HOX-4 GENES AND THE MORPHOGENESIS OF MAMMALIAN GENITALIA. GENES DEV. 5: 1767-1776

DOORBAR J. 2005. THE PAPILLOMAVIRUS LIFE CYCLE JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY. 32S ; S7–S15

DYSON N, HOWLEY PM, MUNGER K, HARLOW E. 1989. THE HUMAN PAPILLOMA VIRUS-16 E7 ONCOPROTEIN IS ABLE TO BIND TO THE RETINOBLASTOMA GENE PRODUCT. SCIENCE 243:934–937

ELIZABETH WARD, PhD5; DAVID FORMAN, PhD6. 2011. GLOBAL CANCER STATISTICS. CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS.. 2011.

FEHRMANN F, KLUMPP DJ, LAIMINS LA. 2003. HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 31 E5 PROTEIN SUPPORTS CELL CYCLE PROGRESSION AND ACTIVATES LATE VIRAL FUNCTIONS UPON EPITHELIAL DIFFERENTIATION. J. VIROL. 77:2819–2831

FLORIN L, SAPP C, STREECK RE, SAPP M. 2002. ASSEMBLY AND TRANSLOCATION OF PAPILLOMAVIRUS CAPSID PROTEINS. JOURNAL OF VIROLOGY. 10009–10014

GAE"LE A.V. BOULET,¹ CAROLINE A.J. HORVATH,¹ SARAH BERGHMANS,² AND JOHANNES BOGERS^{1,2}HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN CERVICAL CANCER SCREENING: IMPORTANT ROLE AS BIOMARKER CANCER EPIDEMIOL BIOMARKERS PREV 2008;17(4). APRIL 2008

GANGULY N, SURAJ PP. 2009. HUMAN PAPILLOMAVIRUS E6 AND E7 ONCOPROTEINS AS RISK FACTORS FOR TUMORIGENESIS. JOURNAL BIOSCIENCE. 34: 113–123

GRAVITT PE, PEYTON CL, ALESSI TQ, WHEELER CM, COUTLE'EF, HILDESHEIM A, SCHIFFMAN MH, SCOTT DR, APPLE RJ. 2000. IMPROVED AMPLIFICATION OF GENITAL HUMAN PAPILLOMAVIRUSES. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 357–361

GUTIÉRREZ-XICOTÉNCATL L, PLETT-TORRES T, MADRID-GONZÁLEZ CL, MADRID-MARINA V. MOLECULAR DIAGNOSIS OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN THE DEVELOPMENT OF CERVICAL CANCER. SALUD PUBLICA MEX 2009;51 SUPPL 3:S479-S488.(CLIN OBST GYNECOL. 2005; 48(1): 77-97

GUTIÉRREZ-XICOTÉNCATL L, PLETT-TORRES T,MADRID-GONZÁLEZ CL, MADRID-MARINA V. 2009. MOLECULAR DIAGNOSIS OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN THE DEVELOPMENT OF CERVICAL CANCER. SALUD PUBLICA MEX HIGH-GRADE LESIONS IN WOMEN WITH MINOR CERVICAL ABNORMALITIES.

HEINZEL, P. A., S. Y. CHAN, L. HO, M. O'CONNOR, P. BALARAM, M. S. CAMPO, K. FUJINAGA, N. KIVIAT, J. KUYPERS, H. PFISTER, B. M. STEINBERG, S. K. TAY, L. L. VILLA, AND H. U. BERNARD. 1995. VARIATION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 6 (HPV-6) AND HPV-11 GENOMES SAMPLED THROUGHOUT THE WORLD. J. CLIN. MICROBIOL. 33:1746–1754.

HORVATH C., BOULET G., RENOUX V., DELVENNE P., BOGERS J. 2010. MECHANISMS OF CELL ENTRY BY HUMAN PAPILLOMAVIRUSES: AN OVERVIEW VIROLOGY JOURNAL 2010, 7:11

HO L., CHAN S., BURK R., FUJINAGA K., ICENOGL E J., KAHN T., KIVIAT N., LANCASTER W., NAZOS P., LABROPOULOU V., ROSENBAUM S., NORRILD B., PILLAI R., STOERKER J., SYRJAENEN K., SYRJAENEN S., TAY S., VILLA L., WHEELER C., WILLIAMSON A., ULRJCH H.1993 THE GENETIC DRIFT OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 IS A MEANS OF RECONSTRUCTING PREHISTORIC VIRAL SPREAD AND THE MOVEMENT OF ANCIENT HUMAN POPULATIONS. JOURNAL OF VIROLOGY; P. 6413-6423

HUMMEL M, HUDSON JB, LAIMINS LA. 1992. DIFFERENTIATIONINDUCED AND CONSTITUTIVE TRANSCRIPTION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 31B IN CELL LINES CONTAINING VIRAL EPISOMES. J. VIROL. 66:6070–6080.

ILLADES .B, CORTÉS E., ANTONIO V., ZAMUDIO N., ALARCÓN L., FERNÁNDEZ G., HERNÁNDEZ D., TERÁN M., FLORES E., LEYVA M. 2009. CERVICAL CARCINOMA IN SOUTHERN MEXICO: HUMAN PAPILLOMAVIRUS AND COFACTORS. *CANCER DETECT PREV.* 32(4):300-7.

JEMAL A., BRAY F., MELISSA M., JACQUES F., KOSS L. 1989. THE PAPANICOLAOU TEST FOR CERVICAL CANCER DETECTION. A TRIUMPH AND A TRAGEDY. 3;261(5):737-43.

JUÁREZ A. JUÁREZ C. 2008. VACCINE AGAINST HUMAN PAPILLOMA VIRUS. *REV MED INST MEX SEGURO SOC.*46(6):631-7.]

LAZCANO E., HERRERO R., MUÑOZ N., CRUZ A., SHAH K., ALONSO P., HERNÁNDEZ P., SALMERÓN J. HERNÁNDEZ M. 2011. EPIDEMIOLOGY OF HPV INFECTION AMONG MEXICAN WOMEN WITH NORMAL CERVICAL CYTOLOGY. *INT. JOURNAL. CANCER:* 91, 412–420

LAZCANO PE, LORINCZ AT, SALMERON J, FERNANDEZ I, CRUZ A, HERNANDEZ P, MEJIA I, HERNANDEZ AM. .2010. PILOT STUDY OF HPV DNA AND CYTOLOGY TESTING IN 50,159 WOMEN IN THE ROUTINE MEXICAN SOCIAL SECURITY PROGRAM. *CANCER CAUSES CONTROL.* (10) :1693-700.

LEECHANACHAI P, BANKS L, MOREAU F, MATLASHEWSKI G. 1992. THE E5 GENE FROM HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 IS AN ONCOGENE WHICH ENHANCES GROWTH FACTOR-MEDIATED SIGNAL TRANSDUCTION TO THE NUCLEUS. *ONCOGENE.* 7:19–25.

LEWIS EB (1978). A GENE COMPLEX CONTROLLING SEGMENTATION IN DROSOPHILA. *NATURE* 276: 565–570.

LIN Z, MA H, NEIL M. 2008. ULTRACONSERVED CODING REGIONS OUTSIDE THE HOMEBOX ON MAMMALIAN HOX GENES. *BMC EVOLUTIONARY BIOLOGY.* 8:260

LIZANO M., DE LA CRUZ E., CARRILLO E., GARCÍA A., PONCE S., DUEÑAS A., HERNÁNDEZ D., MOHAR A. 2006. DISTRIBUTION OF HPV16 AND 18 INTRATYPIC VARIANTS IN NORMAL CYTOLOGY, INTRAEPITHELIAL LESIONS, AND CERVICAL CANCER IN A MEXICAN POPULATION. *GYNECOLOGIC ONCOLOGY, VOLUME 102,* : 230-235

LONDESBOROUGH P, HO L, TERRY G, CUZICK J, WHEELER C, SINGER A. MAGNUSSON PKE, LICHTENSTEIN P, GYLLENSTEIN UB. 2000. HERITABILITY OF CERVICAL TUMORS. *INT. J. CANCER,* 88: 698-701

LONG X., Nancy B., KIVIAT N., HILDESHEIM A., DENISE A. GALLOWAY D., FUNCTION F. 2009. *VIRUS GENES.* 24:275–90. . . ,

LÓPEZ R., PINEDA M., ORTIZ J. VALDEZ. 2009 .NEOPLASIA AND INVASIVE CARCINOMA IN SAN LUIS POTOSÍ CITY, MEXICO INFECTIOUS AGENTS AND CANCER. 4:3

MATSUMOTO K, OKI A, FURUTA R, MAEDA H, YASUGI T, TAKATSUKA N, MITSUHASHI A, FUJII T, HIRAI Y, IWASAKA T, YAEGASHI N, WATANABE Y, NAGAI Y, KITAGAWA T, YOSHIKAWA H. 2010. PREDICTING THE PROGRESSION OF CERVICAL PRECURSOR LESIONS BY HUMAN PAPILOMAVIRUS GENOTYPING: A PROSPECTIVE COHORT STUDY. INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER.

OLIVEIRA N., MÉNDEZ D., PERONE C., NÉLIO J., MELO V., BRASILEIRO G. COMPARISON OF HPV GENOTYPING BY TYPE-SPECIFIC PCR AND SEQUENCING. 2010. MEM INST OSWALDO CRUZ; 105(1): 73-78

NAUCLER P., RYD W., TÖRNBERG S., STRAND A., WADELL G., ELFGREN K., RÅDBERG T., STRANDER B., FORSLUND O., HANSSON B., HAGMAR B., JOHANSSON B., RYLANDER E., DILLNER J. 2009. EFFICACY OF HPV DNA TESTING WITH CYTOLOGY TRIAGE AND/OR REPEAT HPV DNA TESTING IN PRIMARY CERVICAL CANCER SCREENING. J NATL CANCER INST;.21;101(2):88-99.

NEGRINI BP, SCHIFFMAN MH, KURMAN RJ, BARNES W, LANNOM L, MALLEY K, BRINTON LA, DELGADO G, JONES S, TCHABO JG. 1990. ORAL CONTRACEPTIVE USE, HUMAN PAPILOMAVIRUS INFECTION, AND RISK OF EARLY CYTOLOGICAL ABNORMALITIES OF THE CERVIX. 1;50(15):4670-5.

MCCREDIE MR, SHARPLES KJ, PAUL C, BARANYAI J, MEDLEY G, JONES RW, SKEGG DC. 2008. NATURAL HISTORY OF CERVICAL NEOPLASIA AND RISK OF INVASIVE CANCER IN WOMEN WITH CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA 3: A RETROSPECTIVE COHORT STUDY. LANCET ONCOL ;9(5):425-34.

PALACIO MLS, LAZCANO PE, ALLEN LB, HERNÁNDEZ ÁM. 2009. DIFERENCIAS REGIONALES EN LA MORTALIDAD POR CÁNCER DE MAMA Y CÉRVIX EN MÉXICO ENTRE 1979 Y 2006. SALUD PUBLICA MEX ; 51 SOPLA 2:S208-S219

PAPILOMAVIRUS GENOTYPE AS A PREDICTOR OF PERSISTENCE AND DEVELOPMENT OF PHYLIS A. WINGO, CANCER REGISTRIES AND MONITORING THE IMPACT OF PROPHYLACTIC HUMAN PAPILOMAVIRUS VACCINES: THE POTENTIAL ROLE CANCER. 2010 JUN 1;116(11):2531-42.

PIÑA P., HERNÁNDEZ, LÓPEZ R., VÁZQUEZ G., PÉREZ C., LIZANO M., SOBERÓN Y., GONZA´ LEZ J., CRUZF., SALCEDO M. HUMAN PAPILLOMAVIRUS-SPECIFIC VIRAL TYPES ARE COMMON IN MEXICAN WOMEN AFFECTED BY CERVICAL LESIONS INT J GYNECOL CANCER 2006, 16, 1041-1047

PORRASC C., SCHILLER J., LOWYD R., HERREROC R., PINTOA L., 2011 VACCINE. 2011. RACE-RELATED DISTRIBUTION AND PERSISTENCE .JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE, VOL. 98, NO. 15:2011-2015.

RAÚL AGUIRRE HERNÁNDEZ, LEOPOLDO MEDINA CARRILLO, HÉCTOR MONTOYA FUENTES, JOSÉ GUADALUPE SANDOVALLÓPEZ, MIGUEL PADILLA ROSAS, VALENTÍN GARCÍA SILVA, ARMANDO JÁUREGUI MARTÍNEZ1 2007. FACTORES RELACIONADOS CON EL CÁNCER CERVICOUTERINO EN EL ESTADO DE NAYARIT, MÉXICO GINECOL OBSTET MEX; 75:311-6

SÁNCHEZ M., GARZA, RIEGO L. 2010. HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 VARIANTS IN CERVICAL INTRAEPITHELIAL

SANJOSÉ S., DIAZ M., CASTELLSAGUÉ X. (2007). WORLDWIDE PREVALENCE AND GENOTYPE DISTRIBUTION OF CERVICAL HUMAN PAPILLOMAVIRUS DNA IN WOMEN WITH NORMAL CYTOLOGY: A META-ANALYSIS. LANCET INFECT DIS; 7: 453-459

SARAIYA M., GOODMAN M., DATTA S., CHEN V., NEGRINI BP, SCHIFFMAN MH, KURGAN RJ. 1990. ORAL CONTRACEPTIVE USE, HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN-FECTION, AND RISK OF EARLY CYTOLOGICAL ABNORMALITIES OF THE CERVIX. CANCER RES. 50;15: 4670-5

SICHERO L. Y VILLA L. 2006. EPIDEMIOLOGICAL AND FUNCTIONAL IMPLICATIONS OF MOLECULAR VARIANTS OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS. BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH (2006) 39: 707-717

STEGER G, CORBACH S. 1997. DOSE-DEPENDENT REGULATION OFTE EARLY PROMOTER OF HPV 18 BY THE VIRAL E2 PROTEIN. J. VIROL. 71:50-58.

TOMAKIDI P, CHENG H, KOHL A, KOMPOSCH G, ALONSO A. 2000. CONNEXIN 43 EXPRESSION IS DOWNREGULATED IN RAFT CULTURES OF HUMAN KERATINOCYTES EXPRESSING THE HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 E5 PROTEIN. CELL AND TISSUE RESEARCH. 301:323-7

TROY J. KEMPA,1, ALLAN HILDESHEIMB A.,1, , MAHBOOBEH SAFAEIANB M.,1, JOSEPH G. DAUNERA J.,1, YUANJI PANA Y.,1,

ULRICH BH. 2005. THE CLINICAL IMPORTANCE OF THE NOMENCLATURE, EVOLUTION AND TAXONOMY OF HUMAN PAPILLOMAVIRUSES JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY. 32S; S1–S6

VELÁZQUEZ MN, PAREDES MA, PÉREZ HT, SANTOS LG, REYES JL, VALLEJO RV. 2009. PREVALENCE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS GENOTYPES IN WOMEN FROM A RURAL REGION OF PUEBLA, MEXICO. INTERNATIONAL JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES.13; 690—695

WEIMIN QU, JIANG G, CRUZ Y, CHANG CJ, HO GYF, KLEIN RS, BURK RD. 1997. PCR DETECTION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS: COMPARISON BETWEEN MY09/MY11 AND GP51/GP61 PRIMER SYSTEMS. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 1304–1310

WHEELER C., JESSE HO J. , , LAURA A. KOUTSKY J. HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 AND 18 VARIANTS: WILSON VG, WEST M, WOYTEK K, RANGASAMY D. 2002. PAPILLOMAVIRUS E1 PROTEINS: WRIGHT TC. CERVICAL CANCER SCREENING IN THE 21ST CENTURY: IS IT TIME TO RETIRE THE PAP SMEAR? CLIN OBST GYNECOL 2007; 50:313 – 23.

YAMADA T., MANOS M., PETO J., GREER C., MUNˆOZ N., BOSCH X., WHEELER C. 1997. HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 SEQUENCE VARIATION IN CERVICAL CANCERS: A WORLDWIDE PERSPECTIVE JOURNAL OF VIROLOGY. 2463–2472