



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**Conformación y Descripción Estadística de un Banco
de Tejidos Cervicales en Mujeres Mexicanas**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

PERLA XOCHITL ESTAÑOL DÍAZ



México D.F

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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Homero Hernández y Montes
VOCAL: Dr. Samuel Canizales Quinteros
SECRETARIO: Dr. Mauricio Salcedo Vargas
1º SUPLENTE: Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta
2º SUPLENTE: Dra. Rocío Gabriela Tirado Mendoza

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de oncología genómica, UIMEO, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

ASESOR DEL TEMA: _____

Dr. Mauricio Salcedo Vargas

SUPERVISOR TÉCNICO: _____

M. en C. Vanessa Villegas Ruíz

SUSTENTANTE: _____

Perla Xochitl Estañol Díaz

Agradecimientos

En primer lugar, tengo que dar las gracias a todas y cada una de las personas que, detrás de este trabajo hicieron posible que el día de hoy haya terminado con él y me encuentre en este punto de la vida; culminando con este ciclo en la formación de la persona que ahora soy.

Gracias especialmente a mis Padres, no tengo palabras para expresar la gratitud que siento por el inmenso esfuerzo que hicieron para darme esta oportunidad; a mi Mamá que sin su presencia, guía y amor no se en donde estaría, que a pesar de todo me apoyó cuando más la necesitaba aun cuando no lo aceptaba y siempre trato de entenderme; a mi Papá que sin su incansable esfuerzo, trabajo y dedicación me dio todo para que yo siguiera adelante, aun cuando más difícil estuvo la situación y nunca perdió la fe en mí, gracias por tus sabias palabras. Agradezco, cada consejo, regaño o estímulo que me dieron durante toda mi vida, sin ustedes no sería lo que ahora soy, los amo muchísimo.

A mi hermana Paty, le agradezco su cariño, que se convirtiera en mi apoyo y esos hombros donde llorar, supiste cuándo hacerme ver mis errores y llamar mi atención, hermanita fuiste y seguirás siendo una inspiración y modelo a seguir. Siempre he podido contar contigo pa las buenas y más pa las malas. Gracias por enseñarme todos los días cosas nuevas.

A mi hermana Brenda, caray como decir que con tu peculiar forma de decir las cosas me calabas bien hondo y motivabas a seguir, chaparra gracias por tu sarcasmo jajaja gracias por los consejos, jaladas de oreja, cariño, apoyo y por enseñarme a ver las cosas de diferente manera, por tratar siempre de entenderme aun cuando era muy desesperante o difícil para ti, por hacer mancuerna conmigo, chaparra eres mi inspiración.

Por elegirme como amiga, ni más ni menos que muchas gracias a todos mis amigos, fueron una pieza clave en todo este proceso, de verdad que no se cómo agradecer las palabras de aliento, apoyo, consejos, regaños, ayuda y su gran fe en mi, a decir verdad, son lo mejor que me pudo haber pasado, gracias a ustedes he aprendido, crecido, explorado nuevos aspectos de mí, me han inyectado de esa energía tan padre que me ayudo cuando más lo necesité y no sé si lo demuestro, pero los quiero mucho y espero que sigan en mi vida como hasta ahora. Y como quiero que esto pase a la historia, deseo nombrar a Diana Díaz, Lucero Chávez, Viry Alatorre, Aneli Chávez, Orlando Flores, Charles Poucell, Clau Rivera, Gris Gutiérrez, Ise Yaneth, Delia Abad, Moy, Jade Rodríguez, Miry Parra, Pablo Romero, Mony, Leslie, Jules, Yetzi, Ale, Lucero, Hugo, Vane, Angie, Fer, Serge y bueno muchos mas pero que no sigo escribiendo por qué no terminaría.

A mis tías y primos por su cariño, apoyo, consejos y por abrirme las puertas de su casa todo este tiempo, en verdad muchas gracias.

A la UNAM, por darme la oportunidad de formar parte de ella y brindar sin miramientos y poner al alcance el conocimiento en los mejores profesores que pude haber encontrado en la Facultad de Química, Facultad tan amada que me formó como individuo y profesionista.

Al Dr. Mauricio Salcedo, por la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Oncología Genómica, por las enseñanzas y consejos que me brindó en mi estancia. A mi asesora técnica la M. en C. Vanesa Villegas por el tiempo, la dedicación, los consejos, el apoyo tanto fuera como dentro del laboratorio, por su amistad y sus enseñanzas que contribuyeron a mi formación como profesionista.

Y bueno porque no, a Perla Xochitl Estañol Díaz por no rendirte cuando tuviste la oportunidad y sacar la fuerza de donde no había; por haber tomado la mejor decisión de tu vida, seguir adelante.

Gracias.

Índice General

	Página
Índice de Tablas	I
Índice de Figuras	III
Índice de Grafico	VI
1. Introducción	1
1.1 Banco de Tejidos	1
1.1.1 Definición	2
1.1.2 Importancia	4
1.1.3 Estructura y Diseño	6
1.1.4 Aspectos Éticos y Legales	10
1.1.5 Muestras y Preservación	13
1.2 Lesiones del Cérvix Uterino	15
1.2.1 Cáncer de Cérvix	18
1.2.1.1 Epidemiología del cáncer de cérvix	18
1.2.1.2 Factores de Riesgo del Cáncer de Cérvix	21
1.3 Virus de Papiloma Humano (VPH)	22
1.3.1 VPH y su relación con las Lesiones del Cérvix Uterino	24
1.3.2 Tipos virales y su Frecuencia.	25
2. Justificación	28

3. Objetivos	29
3.1 Objetivo General	29
3.2 Objetivos Particulares	29
4. Material y Métodos	30
4.1 Población Estudiada	31
4.2 Criterios de Exclusión	32
4.3 Colección de muestras	31
4.3.1 Carta de Consentimiento Informado	32
4.3.2 Elaboración de un archivo clínico de las pacientes con lesiones de cérvix	33
4.4 Procesamiento de Muestras	33
4.4.1 Tinción H&E	35
4.4.2 Evaluación Histopatológica del Tejido	38
4.4.3 Extracción DNA	39
4.5 Estrategia para la identificación de la presencia de Virus de Papiloma Humano en Banco de Tejidos.	40
4.5.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	40
4.5.2 INNO-LiPA	42
4.6 Análisis Estadístico	44
5. Resultados	45
5.1 Características generales del Banco de Tejidos de Lesiones cervicales	45
5.1.1 Edad de la Paciente.	45

5.1.2 Escolaridad.	47
5.1.3 Uso de Anticonceptivos.	48
5.1.4 Número de Embarazos.	48
5.1.5 Número de Parejas sexuales.	49
5.1.6 Inicio de vida sexual activa (IVSA).	49
5.1.7 Inicio de la Menarca y Menopausia.	50
5.1.8 Efecto del Tabaquismo y Alcoholismo.	50
5.2 Histología.	51
5.3 Detección del Virus de Papiloma Humano.	53
5.4 Frecuencia del Virus de Papiloma Humano.	56
5.5 Análisis Descriptivo.	60
5.5.1 Edad vs Diagnóstico.	60
5.5.2 Escolaridad vs Diagnóstico.	61
5.5.3 Número de Embarazos vs Diagnóstico.	62
5.5.4 Menarca vs Diagnóstico.	63
5.5.5 Menopausia vs Diagnóstico.	63
5.5.6 Inicio de vida sexual activa (IVSA) vs Diagnóstico.	64
5.5.7 Parejas sexuales vs Diagnóstico.	65
5.5.8 Uso de Anticonceptivos vs Diagnóstico.	66
5.5.9 Tabaquismo y Alcoholismo vs Diagnóstico.	66
5.5.10 Antecedente de Familiar con cáncer vs Diagnóstico.	67
5.5.11 Infección con Virus de Papiloma Humano vs Diagnóstico.	68

5.5.12 Tipo de infección por Virus de Papiloma Humano vs
Diagnóstico.

	69
6. Discusión	70
7. Conclusiones	74
8. Perspectivas	75
9. Anexo I	76
10. Bibliografía	79

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1. Características de las necesidades básicas según el tipo de investigación a desarrollar para la formación de un Banco de Tejidos. Referencia 1.	3
Tabla 2. Secuencia y tamaño de amplicón de los primers utilizados en la detección de VPH.	46
Tabla 3. Grupos de lesiones que conforman el Banco de Tejidos de Lesiones Cervicales, de acuerdo al diagnóstico histopatológico.	50
Tabla 4. Cantidad total de muestras analizadas en el Banco de Tejidos con algún tipo de infección con VPH.	51
Tabla 5. Tipos de Coinfecciones presentes en el Banco de Tejidos.	52
Tabla 6. Muestras del Banco de Tejidos con algún tipo de infección por VPH.	63
Tabla 7. Tabla de contingencia Edad vs Diagnóstico, $p=0.00$	63
Tabla 8. Tabla de contingencia entre el nivel de Escolaridad vs Diagnóstico. $p=0.12$	64
Tabla 9. Tabla de contingencia para el análisis del número de Embarazos y el Diagnóstico. $p=0.00$	68
Tabla 10. Tabla de contingencia del análisis comparativo entre el Diagnóstico y la edad de inicio de la Menarca en la población estudiada. $p= 0.04$	69
Tabla 11. Tabla de contingencia del análisis comparativo Chi cuadrada entre la edad de Menopausia y Diagnóstico. En este caso las muestras diagnosticadas con LEIBG, ninguna de las pacientes se encontraba en Menopausia, por consiguiente solo se observan 3 grupos. $p= 0.24$	70
Tabla 12. Tabla de contingencia de la relación entre IVSA y Diagnóstico. $p= 0.30$	71
Tabla 13. Relación de número de PS vs Diagnóstico. $p=0.14$	72

Tabla 14. Análisis comparativo entre uso de Anticonceptivos y Diagnóstico, $p= 0.33$.	73
Tabla 15. Relación entre la existencia de un Familiar con Cáncer y la neoplasia desarrollada.	74
Tabla 16. Comparación entre la presencia o ausencia de infección por VPH y la Neoplasia.	75
Tabla 17. Relación estadística entre el tipo de infección con el Diagnóstico.	76

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Diseño informático para una Base de Datos. Un modo inventariado es fundamental para el sistema, el cual puede proporcionar los datos específicos del paciente, mientras que mantiene un inventario en tiempo real de los depósitos de muestra y/o retiros de las mismas. Las imágenes digitales de los documentos clínicos que acompañan las muestras se crean y se almacenan utilizando un sistema de digitalización de documento ahorrando espacios y tiempos de búsqueda. Referencia 6.	9
Figura 2. La Zona de Transformación del cérvix es un área metaplásica escamosa donde el epitelio escamoso estratificado del exocérnix progresa profundizando y reemplazando al epitelio glandular del endocérnix. El tejido metaplásico es especialmente susceptible al potencial carcinogénico del VPH. Referencia 10.	16
Figura 3. Infección por VPH y su progresión de lesiones cervicales a cáncer invasor. La células basales en el epitelio cervical se encuentran en la membrana basal, la cual esta soportada por la dermis. El VPH se piensa que tiene acceso a las células basales a través de micro abrasiones en el epitelio cervical. Una vez infectada la célula hay una serie de lesiones que pueden progresar a cáncer invasor. Referencia 16.	17
Figura 4. A: Lesión escamosa Intraepitelial de bajo grado (LEIBG), con coilocitosis atípica, hiper Cromasia, proliferación parabasal. B: Lesión escamosa de alto grado (LEIAG), proliferación de células inmaduras, hiper Cromasia, núcleo alargado. Referencia 15.	18
Figura 5. Cáncer cervical invasor. Referencia 17.	19
Figura 6. Estimado de nuevos casos de cáncer y muertes a nivel mundial para los tipos de cáncer más importantes por nivel de desarrollo económico, 2008. GLOBOCAN 2008.	20
Figura 7. Edad estandarizada de incidencia y mortalidad para cáncer cervicouterino. GLOBOCAN 2008.	21
Figura 8. Organización del DNA circular de VPH y su integración al DNA de la célula hospedero. El VPH está dividido en 8 regiones de lectura abierta- E6, E7, E5, E4, E2, E1, y L1 y L2-	24

denominada “E” por early (en inglés: temprana) y “L” por late (tardía, en inglés). En el desarrollo de CaCu la molécula viral se integra al DNA de la célula hospedero. El anillo se abre en el marco de lectura de E2, interrumpiendo la continuidad del gen. Parte de E2- E4, E5 y parte de L2- son eliminados después de la integración (marcados con un asterisco partes de estos genes). LCR, Región larga de control, que no contiene marco de lectura alguno. Referencia 22.

Figura 9. Ciclo de vida del Virus del Papiloma Humano. Infección, Replicación y Liberación. Referencia 22. **25**

Figura 10. Control de la célula hospedero que interfiere con la progresión inducida por VPH. Referencia 22. **26**

Figura 11. Tipos específicos del VPH prevalencia en 15,613 mujeres sin anomalías cervicales en las encuestas de prevalencia del VPH IARC. Referencia 30. **27**

Figura 12. Estandarización por edad de frecuencias de tipos de VPH. Referencia 30 **28**

Figura.13. Algoritmo del proceso de toma y procedimiento de muestras para el Banco de Tejidos. **31**

Figura 14. Esquematización del procesamiento general de la muestra posterior a su colección. **38**

Figura 15. Esquema del proceso de deshidratación de una muestra de tejido para su inclusión en parafina. Referencia 31. **39**

Figura 16. Proceso generalizado para obtener cortes histológico de tejidos incluidos en parafina. Referencia 31 **41**

Figura 17. Pasos que durante una tinción general de hematoxilina-eosina. Referencia 31. **42**

Figura 18. Esquema general del proceso de tipificación viral (VPH) a muestras del Banco de Tejidos. **44**

Figura19. A: Tejido Sin Lesión (Hematoxilina & Eosina 40X). **B:** Tejido con LEIBG (Hematoxilina & Eosina 40X). **C:** Tejido con LEIAG (Hematoxilina & Eosina 20X). **D:** Tejido con Cáncer **58**

Cérvicouterino (Hematoxilina & Eosina 40X).

Figura 20. Electroferograma para visualizar los productos de PCR que amplificaron para la infección por VPH 16. **Pozo 1:** Marcador de peso molecular; **Pozo 2:** Control Positivo para VPH 16 (línea celular Caski); **Pozos 3 y 4:** Control Negativo; **Pozos 5, 6, 7, 9 y 10:** Muestras positivas para VPH 16; **Pozo 8:** Muestra negativa para la presencia de VPH 16. **59**

Figura 21. Electroferograma para visualizar los productos de PCR de la región mitocondrial constitutiva, control interno. **Pozo 1:** Marcador de peso molecular; **Pozo 2:** Control positivo (línea celular Caski); **Pozo 3:** Control negativo de la prueba; **Pozos 4 al 9:** Muestras positivas a la región mitocondrial constitutiva. **60**

Figura 22. Electroferograma para visualizar los productos de PCR para la presencia de VPH general. **Pozo 1:** Marcador de peso molecular; **Pozo 2:** Control positivo a VPH (línea celular Hela); **Pozos 3 y 4:** Control negativo; **Pozos 5, 7 al 13:** Muestras positivas a la presencia de VPH; **Pozos 6 y 14:** Muestras negativas a la presencia de VPH. **61**

Figura 23: Tiras donde se da la Hibridación. **Tira 1, 6:** Controles negativos; **Tiras 2, 7:** Controles positivos; **Tiras 3, 4, 5, 8 - 20:** Muestras que fueron sometidas al Kit INNO-LiPA HPV (los resultados para las pruebas fueron muy variados). **62**

Índice de Gráficos

	Página
Grafico 1. Representación grafica del porcentaje de cada grupo que conforma el Banco de Tejidos.	50
Grafico 2. Histograma de frecuencias en función de la Edad. Media= 48 años.	51
Grafico 3. Representación grafica del porcentaje distribuido de acuerdo al nivel de escolaridad.	52
Grafico 4. Representación grafica del porcentaje de pacientes que usaron anticonceptivos.	53
Grafico 5. Histograma de frecuencias del número de embarazos. Media = 5 embarazos.	53
Grafico 6. Histograma de frecuencias del número de parejas sexuales en la población. Media =2	54
Grafico 7. Histograma de frecuencia del Inicio de Vida Sexual Activa (IVSA)	55
Grafico 8. Histogramas de la frecuencia de edad para la Menarca y Menopausia respectivamente.	55
Grafico 9. Porcentaje de pacientes que fuman.	56
Grafico 10. Porcentaje de Pacientes con ingesta de alcohol.	56
Grafico 11. Frecuencias del tipo de infección de acuerdo al grado de lesión.	65
Grafico 12. Frecuencia de tipos VPH en los diferentes grupos Lesiones Cervical que conforman el Banco de Tejidos.	66
Grafico13. Comparación estadístico de la Edad vs el Diagnostico.	68
Grafico 14. Representación grafica del análisis comparativo del nivel de Escolaridad vs Diagnostico.	69
Grafico 15. Representación grafica del análisis comparativo entre el número de Embarazos y el Diagnóstico.	70

Grafico 16. Representación grafica del analisis comparativo entre el Diagnóstico y la edad de inicio de la Menarca.	71
Grafico 17. Representación grafica del análisis comparativo de Diagnóstico vs Menopausia.	72
Grafico 18. Representación grafica del comparativo entre IVSA vs Diagnóstico.	73
Grafico 19. Grafico representativo de la comparación entre PS vs Diagnóstico.	74
Grafico 20. Representación de la comparación entre el uso de Anticonceptivos y Diagnostico.	75
Grafico 21. Tabaquismo vs Diagnóstico	76
Grafico 22. Comparación entre Alcoholismo y Diagnóstico.	77
Grafico 23. Familiar con Cáncer vs Neoplasia.	77
Grafico 24. Infección por VPH y el Diagnóstico, comparación.	78
Grafico 25. Representación de la comparaión entre el tipo de infección y el Diagnóstico.	79

1. INTRODUCCIÓN

1.1 BANCO DE TEJIDOS

En la actualidad el desarrollo y cambios de nuevas tecnologías ha permitido la creación de oportunidades y ha abierto nuevas vías a todos los sectores de investigación en cáncer; en la utilización de tejidos para generar datos útiles que proporcionen nuevas hipótesis y pruebas para nuevos tratamientos o alternativas en contra de esta enfermedad o que mejoren la calidad de vida de los afectados; información que vaya en crecimiento con el día a día. Como resultado a esta necesidad la creación de Bancos de Tejidos que alguna vez fueron considerados como simples herramientas para el sector de la investigación básica, ahora puede ser considerada como un motor fundamental para la investigación básica y clínica¹.

La necesidad de interpretación ágil a la práctica clínica y el conocimiento generado por la investigación básica han dado lugar a la medicina traslacional. Por lo general, la investigación básica se olvida o no hace una contribución útil para el tratamiento del paciente. Ciertamente, en los países en desarrollo, los conocimientos adquiridos en las últimas 3 o 4 décadas no ha sufrido el paralelismo adecuado en la repercusión en el manejo del paciente. Hoy en día, no podemos posponer la importancia de la actividad de la medicina traslacional, ya que es una responsabilidad multidisciplinar y no exclusivamente a la preocupación de los involucrados en la práctica clínica².

El Banco de Tejidos es una actividad que va creciendo en Europa, Estados Unidos y Canadá, que se está realizando en numerosos institutos por un tiempo ya considerable y el cual se ha consolidado como fundamental en la investigación y terapéutica³. En América Latina ésta herramienta aun no se considera como tal, dado el esfuerzo humano y económico que implica y no siempre se puede contar con ello, sin embargo en México ya existen proyectos para la creación de Bancos de Tejidos que sirvan en la investigación, claro

ejemplo de esto es el Banco de Tejidos que se está desarrollando en el Instituto Nacional de Cáncer de México (INCan) y el que se pretende hacer en el Hospital de Oncología².

La preservación de muestras frescas del mismo tumor con la integridad de los componentes celulares y la relevancia de la información clínica hacen del Banco de Tejidos una fuente invaluable, en especial para la realización de estudios moleculares a diferentes niveles como el estudio de la carcinogénesis, mutaciones, el comportamiento biológico del tumor, la respuesta y resistencia a diferentes tratamientos y/o estímulos, etc².

Por lo tanto, no podemos ignorar la importancia de la relación que existe entre la investigación y la medicina, como ya se mencionó anteriormente; la conformación de un Banco de Tejidos es una responsabilidad multidisciplinaria y no exclusivamente a la investigación científica para la cual juega un rol fundamental ya que los investigadores usan tejidos de estos bancos para estudiar enfermedades y encontrar métodos más eficaces para diagnosticar, prevenir y tratar el cáncer en el futuro^{1, 8}.

1.1.1 Definición

Un Banco de Tejidos es una colección ordenada de tejido neoplásico, tejido normal y/o fluidos preservados bajo condiciones óptimas, así como el almacenamiento de la historia clínica de los pacientes. Las muestras colectadas y preservadas en el banco de tejidos son usadas para investigación básica y clínica².

Los aspectos básicos de un Banco de Tejidos incluyen protocolos homogéneos y adecuados para la colección, almacenamiento, manipulación y utilización de muestras congeladas para la investigación, enseñanza y atención a los pacientes de cáncer y una política de aseguramiento de la calidad y controles adecuados⁵. Es de suma importancia destacar que los Bancos de Tejidos no son un objetivo, sino sólo herramientas, y como cualquier herramienta su utilidad depende de la meta prevista. El valor real de Bancos de

Tejidos aparece con proyectos científicos de excelencia e integrado en los ensayos clínicos⁵.

Conocimientos actuales en biomedicina, especialmente en la caracterización molecular de los cánceres hace necesario el desarrollar un Banco de Tejidos. El análisis de tejidos y la información clínica relevante para la investigación en la cual los pacientes no estarán directamente involucrados da lugar a preguntas acerca del punto de vista ético y legal, el cual tiene que estar regulado por un comité de ética, ya que la conformación de un Banco de Tejidos implica una gran variedad de conocimientos tanto científicos, médicos, éticos y legales².

El diseño de Bancos de Tejidos es un esfuerzo importante el cual se dedica a obtener datos sobre los resultados clínicos, los cuales permitan conocer a los investigadores la asociación de la información clínica detallada y el resultado de la investigación. Además, un número relativamente grande de ejemplares puede estar disponible en principio para la investigación^{6,7}.

Funciones de base y las necesidades primarias de un Banco de Tejidos¹

La función es proporcionar una fuente de materiales y datos para la investigación y evaluación de resultado de la salud. Las necesidades y características de los materiales necesarios a partir de un Banco de Tejidos no son iguales para los diferentes aspectos y niveles de investigación, resumiéndose a continuación¹ en la Tabla 1.

Tipo de Investigación	Características
Investigación Básica	<ul style="list-style-type: none"> • Unidades de estudio típicos de 3 - 100 casos. • Distribución de tipos de tumor: los grados, las etapas, las características celulares. • Una gran variedad de formatos de tejidos: bloques de tejido en parafina, los bloques congelados del tejido, sueros. • Gama variada de tipos de tejidos: Normal, pre neoplásicos / pre invasoras, las lesiones invasoras, metastásico. • Una amplia histología y patología de datos

<p>Investigación Traslacional</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Unidades de estudio típicos de 100 a 400 casos. • Variedad de tipos de tumor, el tejido de parafina, el suero, normal / pre neoplásicos / lesiones pre invasoras. • Histología y la patología y los datos de resultados clínicos
<p>Investigación Epidemiológica</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Unidades de estudio típicos de la población o región de 1000 casos. • Amplia gama de tipos de casos y el tejido normal y tumoral de los todos casos. • H & E con secciones representativas de la patología, los bloques en parafina. • Patología y datos de resultados clínicos

Tabla 1. Características de las necesidades básicas según el tipo de investigación a desarrollar para la formación de un Banco de Tejidos. Referencia 1.

1.1.2 Importancia

La importante de un Banco de Tejidos en la investigación es su estrecha integración con los ensayos clínicos. De hecho, el mayor sello de la actividad de un Banco de Tejidos no es el número de muestras que contiene, sino el factor de impacto de las publicaciones, con especial referencia al banco como la fuente del tejido⁵.

Los Bancos de Tejidos en la investigación, gracias a la facilidad de muestras para trabajo en investigación, permite a los investigadores entender mejor qué causa el cáncer, qué opciones de tratamiento tienen probabilidades de ser eficaces y cómo mejorar la atención de los pacientes en años venideros. Los Bancos de Tejidos ayudan a estudiar la biología del cáncer; por qué se desarrolla y crece el cáncer, y quiénes corren riesgo de padecerlo. Las respuestas a estas preguntas pueden llevar a diagnósticos más tempranos, precisos y mejores tratamientos. Así como los descubrimientos de la década pasada llevaron a las terapias actuales, los conocimientos adquiridos mediante los presentes estudios de tejido humano harán progresar la atención médica del futuro⁸.

La investigación oncológica actual se puede basar en tres características: 1) La capacidad de estudios a gran escala en genómica, transcriptómica y proteómica, 2) Una alta sensibilidad para las nuevas herramientas tecnológicas 3) La transferencia de la investigación básica a la clínica, lo cual es llamado investigación traslacional. Estas tres características dependen especialmente de los tejidos adquiridos: Ya que los estudios moleculares a gran escala necesitan grandes números de casos para identificar nuevos parámetros importantes en la clínica, las técnicas de biología molecular altamente sensibles requieren del manejo y almacenamiento adecuado de las muestras y la investigación traslacional necesita un muestreo de tejidos homogéneos para evitar el sesgo de los estudios, por ello la importancia de la conformación de un Banco de Tejidos que cumpla con estos tres parámetros y permita la continuidad en la investigación⁵.

La asociación con la informática y los Bancos de Tejidos han sido reconocidos por cerca de una década, por ser herramientas para el avance de la ciencia en las técnicas de la biología molecular. Sin embargo, tan solo en los últimos 2-3 años, los Bancos de Tejidos se han visto vinculados a los resultados clínicos como crucial para lograr el objetivo, desarrollar nuevas terapias o alternativas en la lucha contra el cáncer. Se ha estimado que por el año 2005, al menos el 10% de las pruebas de laboratorios en investigación básica y clínica se han basado en el análisis del DNA y RNA, mismo que es utilizado en investigación. Estos esfuerzos solo han sido posible con la aplicación de Bancos de Tejidos y su asociación a la informática como la nueva unión traslacional entre la información molecular a la importancia clínica⁶.

Otros puntos claves en la clínica donde es relevante la investigación son: En el desarrollo de nuevos marcadores moleculares de pronóstico, predecir que paciente necesita de nuevos o diferentes tipos de tratamientos, la predicción de la respuesta a un determinado tratamiento y el desarrollo de nuevas terapias. La integración de los Bancos de Tejidos y las pruebas clínicas es un punto de lo más crítico y urgente para la investigación traslacional en cáncer. Por tal motivo necesitamos trabajar en la creación de redes y

escenarios legales para el desarrollo de Bancos de Tejidos a nivel nacional y lograr la creación de estas redes⁵.

Para la planeación y logística de un Banco de Tejidos, aspectos técnicos, legales, médicos, de estructura y físicos tiene que ser considerados, los cuales se pueden agrupar en 3 categorías²:

1.1.3 Estructura y Diseño.

1.1.4 Aspectos éticos y legales.

1.1.5 Colección de Muestras y Preservación.

1.1.3 Estructura y Diseño

La estructura se debe planear bajo lo indicado en la Norma Oficial Mexicana NOM-166-SSAI-1997, la cual habla de la organización y función de un laboratorio clínico. Se debe establecer un área para el Banco de Tejidos el cual tenga la organización en estructura y cumpla con los objetivos y funciones para los cuales fue diseñado².

El equipo se puede dividir en equipo de uso general, equipo para la preservación de las muestras y equipo para el control de calidad. El equipo de uso general incluye todo lo que es necesario para la preparación de soluciones, esterilización, almacenamiento de reactivos, etc. Para el área de preservación, podemos utilizar campanas de flujo laminar, equipo para hacer cortes, equipo para enfriar y para ultracongelar a -70°C . Los ultracongeladores (-70°C) son usados para tiempos largos de almacenamiento, por mantener una alta integridad a las muestras que aquellos con más alta temperatura. En el caso de almacenar sangre y suero este debe ser almacenado a -20°C así como reactivos. Los bloques de parafina, rollos de parafina y cortes se preservan mejor en bolsas selladas al vacío a 4°C ⁶. Para el control de calidad se incluyen los termocicladores, cámaras de electroforesis, fuentes de poder, cámaras de transferencia².

La habilidad de las bases de datos para organizar y mantener un inventario de la información deseada puede también ayudar en el seguimiento y cumplimiento con la institución, ser usada para generar reportes de inventario del Banco de Tejidos para ayudar a las peticiones de los investigadores en la disponibilidad de las muestras ⁶.

Se puede utilizar un software comercial para la base de datos clínicos o también puede ser diseñado de acuerdo a las necesidades específicas de la base de datos del Banco de Tejidos ².

Sistema de inventario de un banco⁶.

Los componentes de un sistema deben permitir eficientemente la entrada de datos, consultas y preparación de reportes, también debe permitir la implementación de nuevos servicios. Se debe hacer una consideración para el futuro; el sistema deberá ser diverso.

Idealmente un sistema informático garantiza que la información será:

- ❖ Disponible durante un largo período de tiempo
- ❖ Mantener un formato estandarizado.
- ❖ Capaz de ser difundido a quien requiera la información, según sea necesario.

Requisitos mínimos de datos para un Banco de Tejidos⁶.

- ❖ Todas las muestras debe tener nomenclatura única.
- ❖ El sistema debe ser capaz de mantener un inventario actualizado, de identificación único que incluya: cantidad original y actual de muestras, que muestras se han prestado, cuando han sido devueltas, si se ha agotado. El sistema también debe ser capaz de invalidar las muestras.
- ❖ La información sobre la base de datos de cada muestra no debe ser de libre acceso.

- ❖ El Sistema debe ser capaz de reservar ejemplares de un estudio en particular.
- ❖ El Sistema debe tener el consentimiento informado de los donantes para la investigación que está permitido.
- ❖ El Sistema debe seguir las muestras y permitir la retirada del consentimiento en caso necesario.

El inventariado es el centro del Banco de Tejidos (Figura 1). El cual está vinculado con el etiquetado y el seguimiento de cosas como el consentimiento informado de los tejidos, si hay tejidos reservados o específicamente colectados para un protocolo o estudio. Esto asegura que a las muestras se les realiza un seguimiento y se distribuyan de manera adecuada, así como evitar el agotamiento total de una muestra⁶.

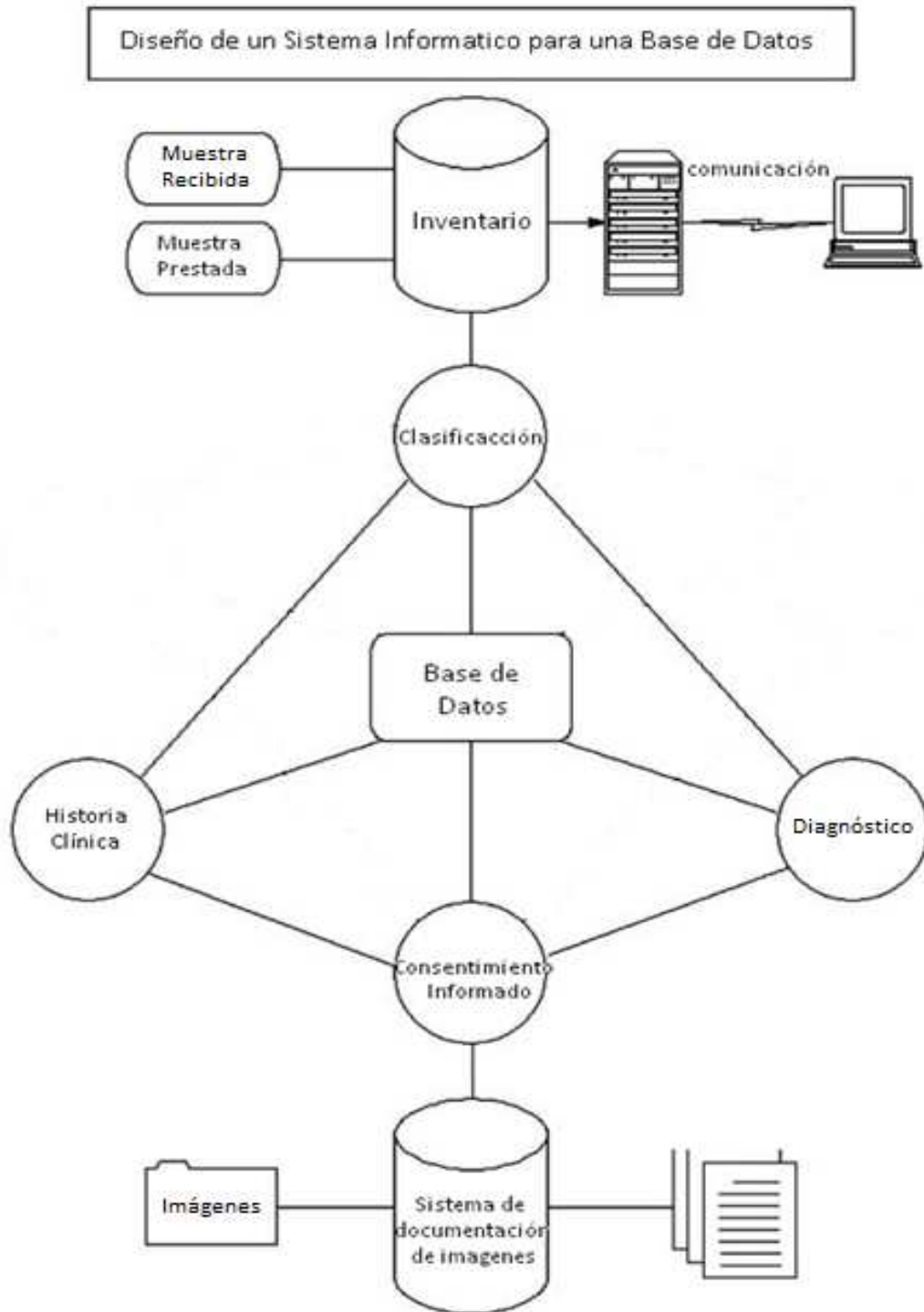


Figura 1. Diseño informático para una Base de Datos. Un modo inventariado es fundamental para el sistema, el cual puede proporcionar los datos específicos del paciente, mientras que mantiene un inventario en tiempo real de los depósitos de muestra y/o retiros de las mismas. Las imágenes digitales de los documentos clínicos que acompañan las muestras se crean y se almacenan utilizando un sistema de digitalización de documento ahorrando espacios y tiempos de búsqueda. Referencia 6.

1.1.4 Aspectos Éticos y Legales

Un Banco de Tejidos siempre será una herramienta de servicios, que generalmente opera de manera pública o privada, con el propósito de usarse con fines terapéuticos o de investigación, hay que señalar que la donación de tejido humano debe proteger los aspectos altruistas de la donación y ser realizada bajo el permiso de la autoridad competente del país en que se esté operando. Esta autoridad debe ver que se cumpla con los principios básicos de ética y con las normas de seguridad sanitarias³. El Banco de Tejidos tiene la responsabilidad de monitorear la implementación de los estándares de calidad y respetar los principios éticos y el incumplimiento de dichas actividades. Debe rechazar los tejidos que procedan de una manera que no tomó en cuenta los aspectos éticos⁴.

En los años recientes la conformación de redes de bancos de tejidos que operan regularmente, están siendo controladas a nivel mundial por el TuBaFrost Consortium en Europa, The Cooperative Human Tissue Network en Estados Unidos, The Spanish National Cancer Research Centre-Spanish National Tumour Bank Network (CNIO-SNTBN) entre otros, todos ellos contribuyendo a la globalización de la ciencia, protegiendo los valores éticos y el mal uso de esta herramienta².

En nuestro país al no existir una institución que se encargue de la regulación de este tipo de herramienta, la conformación del Banco de Tejidos se está guiando por los principios éticos de la institución a la que pertenece así como por el comité de ética de la misma el cual ya ha aprobado la colección de muestras. Así mismo se han seguido los lineamientos de la Red Nacional Cooperativa de Tejidos Humanos, UAB, USA.

Una combinación de factores, incluyendo la investigación de tecnologías mejoradas, se centran cada vez más en las lesiones pre-cancerosas, la escala de la capacidad de investigación, tecnologías de información, base de datos y la adopción de las normas de ética alienta la reevaluación del conocimiento y el valor de las fuentes de los tejidos. En particular, el creciente desafío de mantener un equilibrio ético y práctico entre las prioridades clínicas y de

investigación sobre las muestras pequeñas y lesiones de gran tamaño da pie a supervisar la actividad bancaria en el ámbito clínico¹.

Por consiguiente, el personal que se encarga de la conformación de un Banco de Tejidos no debe tolerar ninguna mala acción o conducta inadecuada en cualquier momento y debe tomar las medidas adecuadas para actuar con rapidez con el fin de corregir cualquier desviación ética y principios adoptados por las autoridades competentes de la institución en el ámbito de Bancos de Tejidos⁴.

Todo el personal del Banco de Tejidos tiene la obligación de hacer el esfuerzo necesario para adoptar los valores éticos, incluidos los esfuerzos para aumentar los donantes de tejidos en la comunidad local⁴:

- ❖ Todo el personal del Banco de Tejidos tiene la responsabilidad de comportarse con los más altos principios de ética.
- ❖ El Banco de Tejidos debe operar respetando todas las leyes y reglamentos aprobados por las autoridades nacionales en el área de la salud competente en el ámbito de Bancos de Tejidos.
- ❖ Ningún pago se dará o recibirá con respecto a las donaciones de tejidos u otras actividades que se lleven a cabo por el Banco de Tejidos, fuera de las consentidas por las autoridades nacionales competentes en área de la salud.
- ❖ Los conflictos de intereses deben evitarse entre el personal del Banco de Tejidos y de los donantes o de la familia del donante.
- ❖ Todo el personal del Banco de Tejidos debe ser alentados a reportar cualquier sospecha de mala acción por el mismo personal del Banco durante el cumplimiento de sus actividades. Si bien se espera que el personal del Banco de Tejidos trabaje con integridad, honestidad y diligencia.
- ❖ Los Bancos de Tejidos deberían facilitar y apoyar las actividades de valiosa investigación con tejidos humanos en beneficio de la comunidad, dentro del marco legal y ético establecido por las autoridades nacionales competentes en el área de la salud.

- ❖ El personal de un Banco de Tejidos deberá proveer los mejores servicios posibles a los donantes de tejidos y los beneficiarios así como deben otorgar la más alta prioridad a la calidad, oportunidad y competitividad en la prestación de estos servicios.

Confidencialidad del paciente

El anonimato es el estado en el cual una persona quiere que su identidad sea desconocida. Hay muchas circunstancias que pueden hacer necesaria el anonimato, algunas de las cuales son²:

- ❖ Protección al paciente
- ❖ Protección de la información
- ❖ Privacidad de información y del paciente
- ❖ Protección de la institución, evitar mal uso de la información y distribución inadecuada, entre otra.

Consentimiento informado

En el caso de proyectos de investigación, este debe ser aprobado previamente por el comité de ética local⁴.

El uso de tejido humano para la investigación requiere prioritariamente del consentimiento libre e informado del paciente o representante legal. Este consentimiento debe ser tomado en persona por el personal del Banco de Tejidos con el paciente o representante legal para que cualquier duda, aclaración o problema se resuelva rápida y de la mejor manera posible.

El paciente o representante legal debe ser informado acerca del propósito o interés de la investigación por el cual es requerido el tejido y asegurar la confidencialidad y seguridad de la información. La protección de la confidencialidad del paciente es de lo más importante como actividad en un Banco de Tejidos y el acceso a la información del paciente tiene que estar restringido a un limitado grupo de personal autorizado⁴.

Y por lo tanto, un Banco de Tejidos se basa en cuatro principios generales que son constantes en la investigación y que buscan resguardar las garantías individuales de los pacientes y de los investigadores mismos²:

- ❖ La expresión específica y clara del consentimiento informado de los pacientes es un elemento indispensable para los investigadores.
- ❖ La justificación científica y aplicación de la investigación para la presentación de los proyectos aprobados y financiados.
- ❖ La protección de la información personal.
- ❖ La misma oportunidad para el acceso de la muestra

En México, se debe de seguir de acuerdo a la Ley General de Salud publicada en 1987. El consentimiento informado, principalmente refiere al propietario del material biológico, el material biológico derivado de la intervención quirúrgica, el uso de dicho material biológico, la información clínica de los pacientes, confidencialidad y el uso de los datos así como el diagnóstico, el uso de fármacos y la propiedad intelectual².

El consentimiento informado es habitualmente proporcionado antes de cualquier procedimiento. Si el consentimiento es denegado la muestra debe ser destruida en caso de haberse obtenido antes, siempre y cuando no sea necesaria para el diagnóstico final del paciente.

1.1.5 Muestras y Preservación

Si bien, se ha mencionado la importancia de los Bancos de Tejidos en la investigación, en especial con el creciente desarrollo tecnológico que se está abriendo en nuestros días es de igual importancia la preservación de dichos tejidos.

Uno de los principales problemas que se tienen en el desarrollo de un Banco de Tejidos es el personal que se encarga de la toma de biopsias y el conocimiento que este debe de poseer para conocer las características de las

biopsias, ya que para los médicos así como enfermeras no siempre están conscientes de la importancia del tejido y lo que implica para la investigación.

Las biopsias de cualquier tipo de tejido deben ser tratadas lo más rápida y eficientemente ya que al momento de ser tomadas comienza el proceso de degradación celular, con lo cual, la pérdida de material genético y con ello la calidad y cantidad. El medio en que se han de preservar debe ser el adecuado según el tipo de pruebas para los cuales sean requeridos, ya sea investigación básica o estudios de biología molecular avanzados, en donde se requiere condiciones y reactivos específicos para su correcta preservación. Todo esto se debe establecer desde un principio para evitar pérdidas innecesarias de tan valiosos tejidos, enfatizando que solo se adquirirán una sola vez, volviéndolos únicos y muy valiosos. El traslado de la muestra del lugar donde se ha tomado al Banco de Tejidos debe ser el pertinente para que el tejido se conserve en las mejores condiciones, todo esto va de la mano con el medio de conservación y dependerá en gran medida para que vaya hacer requerido.

Hay que destacar, que la utilidad de un Banco de Tejidos depende de la capacidad de preservar los tejidos en las condiciones necesarias para lo cual hayan sido colectadas, de igual forma también se debe considerar las nuevas tecnologías en investigación y requerimiento que éstas conllevan por lo cual la estrategia de conservación debe ser lo suficientemente buena o flexible para dar cabida a las nuevas técnicas y no permitir el estancamiento del Banco de Tejidos con lo cual su principal objetivo se perderá y será nulo.

Una vez que la biopsia ha sido tomada, y almacenada en el medio de conservación adecuado y transportada al Banco de Tejidos, se prosigue según el protocolo diseñado. De entrada se debe confirmar el tipo de lesión de la biopsia, por lo cual es necesario que sea revisado por un patólogo, este confirmará la lesión y así el tejido se podrá catalogar adecuadamente. El análisis histológico incluye muchos parámetros como: evaluación del diagnóstico del tumor, porcentaje del tumor, porcentaje del estroma y porcentaje de necrosis⁶.

Hacer confirmación de la viabilidad del tejido es el primer paso en el control de calidad que servirá para la investigación. Para usos moleculares se tendrá que evaluar la integridad molecular del tejido. La calidad del DNA se mide por medio de una PCR, la amplificación de DNA constitutivo y la electroforesis revelará que el DNA tiene buena calidad en el 100% de las muestras⁶. En el caso de RNA existe la posibilidad de utilizar un bioanalizador y determinar el RIN o integridad de este, con lo cual se sabrá si el RNA es apto para las técnicas avanzadas en biología molecular.

1.2 LESIONES DEL CÉRVIX UTERINO

Abarcando los aspectos generales, encontramos que el cérvix normal está dividido en dos zonas epiteliales: exocérvix cubierto por epitelio escamoso y el endocérvix cubierto por epitelio glandular. Como resultado de los cambios hormonales durante la adolescencia y la edad adulta se origina un cambio en la diferenciación del epitelio escamoso llevándolo a epitelio escamoso metaplásico y regenerativo que posteriormente es reemplazado por epitelio escamoso maduro. A esta diferenciación celular del epitelio endocervical se le denomina zona de transformación (Figura 2) en donde se desarrollan lesiones cervicales que pueden llegar a progresar a cáncer de cérvix^{9,11}.

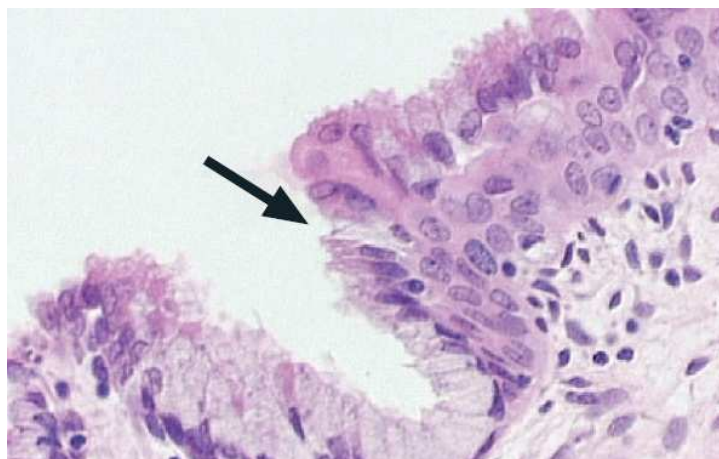


Figura 2. La Zona de Transformación del cérvix es un área metaplásica escamosa donde el epitelio escamoso estratificado del exocérvix progresa profundizando y reemplazando al epitelio glandular del endocérvix. El tejido metaplásico es especialmente susceptible al potencial carcinogénico del VPH. Referencia 10.

La gran importancia de esta zona de transformación radica en su sensibilidad a infectarse por el Virus del Papiloma Humano (VPH), por razones que aun no se saben, en donde es especialmente susceptible al potencial carcinogénico del VPH¹¹.

Las lesiones del cérvix como los carcinomas están influenciadas por el virus del papiloma humano, siendo éste la causa en un 99% de los casos¹². La mayoría de las anomalías cervicales causadas por la infección por VPH tienen poca probabilidad de progresar a una lesión neoplásica o a cáncer cérvicouterino de alto grado, la mayoría retroceden por sí mismas. El largo plazo que transcurre entre la infección inicial y la enfermedad evidente indica que pueden ser necesarios varios factores para que avance la enfermedad¹³.Figura 3

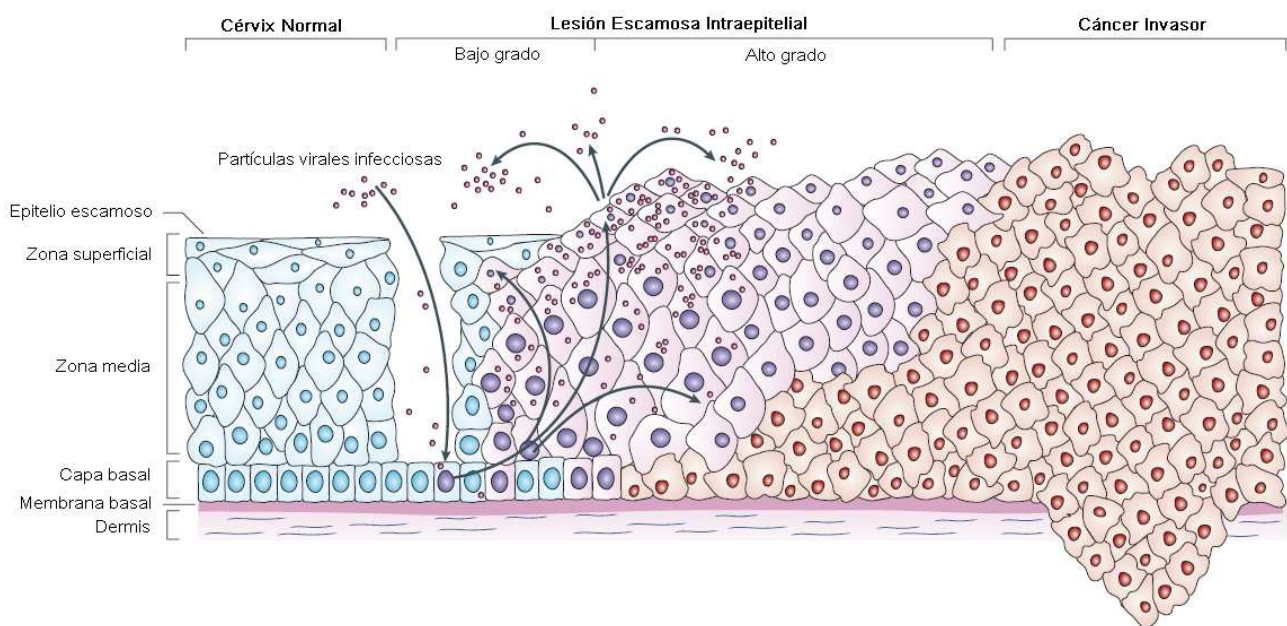


Figura 3. Infección por VPH y su progresión de lesiones cervicales a cáncer invasor. La células basales en el epitelio cervical se encuentran en la membrana basal, la cual esta soportada por la dermis. El VPH se piensa que tiene acceso a las células basales a través de micro abrasiones en el epitelio cervical. Una vez infectada la célula hay una serie de lesiones que pueden progresar a cáncer invasor. Referencia 16.

Como se mencionó anteriormente el VPH infecta preferentemente a células de la zona de transformación. Las células basales las cuales por naturaleza, son blanco de infección por sus características como receptoras al VPH. El VPH permanece en un estado de latencia hasta que ciertos factores

activen la replicación viral y con ello la displasia celular¹⁴. Las células displásicas siempre presentan distribución irregular de la cromatina, como en grumos. Los núcleos anormales en las células superficiales o intermedias indican una lesión de bajo grado, mientras que la anomalía de los núcleos de células parabasales y basales indica lesión de alto grado. El tamaño del núcleo respecto de la cantidad relativa de citoplasma (relación núcleo/citoplasma) es una de las bases más importantes para evaluar el grado de lesión¹³.

En las Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Bajo Grado (LEIBG) existe buena maduración, con mínimas anomalías nucleares y pocas figuras mitóticas (Figura 4A). Se caracterizan por coilocitosis atípica, alargamiento nuclear, hiperchromasia y aclaramiento del citoplasma. En las Lesiones escamosas de alto grado se caracteriza por cambios celulares displásicos restringidos sobre todo a la mitad o los dos tercios inferiores del epitelio, con anomalías nucleares más marcadas que en la lesión de bajo grado (Figura 4B). Igualmente la diferenciación y la estratificación pueden faltar por completo o existir solo en el cuarto superficial del epitelio, con abundantes figuras mitóticas. Las anomalías nucleares aparecen en todo el espesor del epitelio¹³.

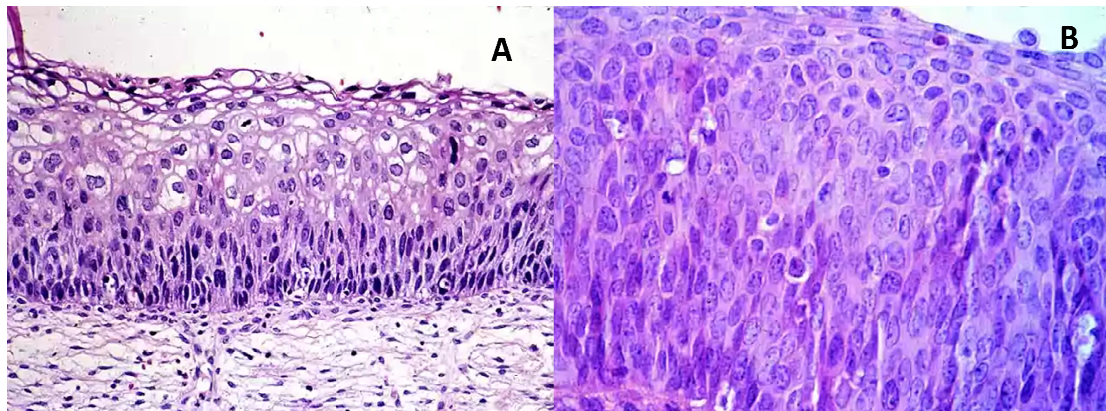


Figura 4. A: Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado (LEIBG), con coilocitosis atípica, hiperchromasia, proliferación parabasal. B: Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado (LEIAG), proliferación de células inmaduras, hiperchromasia, núcleo alargado. Referencia 15.

El cáncer de cérvix se identifica por una serie de lesiones premalignas bien definidas. Como ya se vió antes, estos cambios premalignos presentan un espectro de anormalidades histológicas que van de LEIBG a LEIAG y finalmente a carcinoma invasor¹⁶. Figura 3.

1.2.1 Cáncer de Cérvix

El cáncer de cérvix se caracteriza por un desarrollo celular displásico que produce disrupción de la membrana basal (Figura 5). En general evolucionado a partir de una LEIAG. Su presentación macroscópica en este caso es infiltrativa, con crecimiento hacia el estroma subyacente, y se acompaña de metaplasia escamosa en algunas zonas del epitelio endocervical, hiperchromasia, alargamiento del núcleo¹⁷.

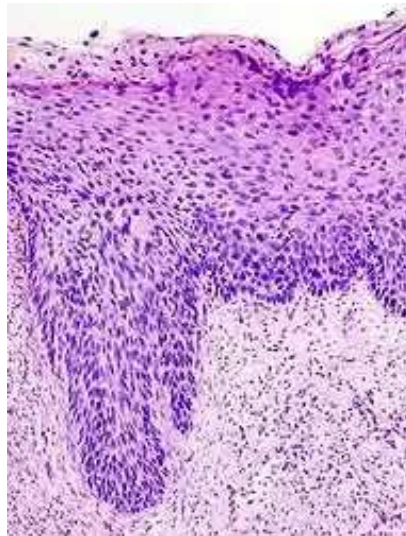


Figura 5. Cáncer cervical invasor. Referencia 17

1.2.1.1 Epidemiología del Cáncer de Cérvix

El Cáncer de Cérvix es el tercero más comúnmente diagnosticado y la cuarta causa principal de muerte por cáncer en las mujeres en todo el mundo, representando el 9% (529,800) total de los casos nuevos de cáncer y un 8% (275,100) de las muertes totales por cáncer entre las mujeres en el 2008 (Figura 6)¹⁸.

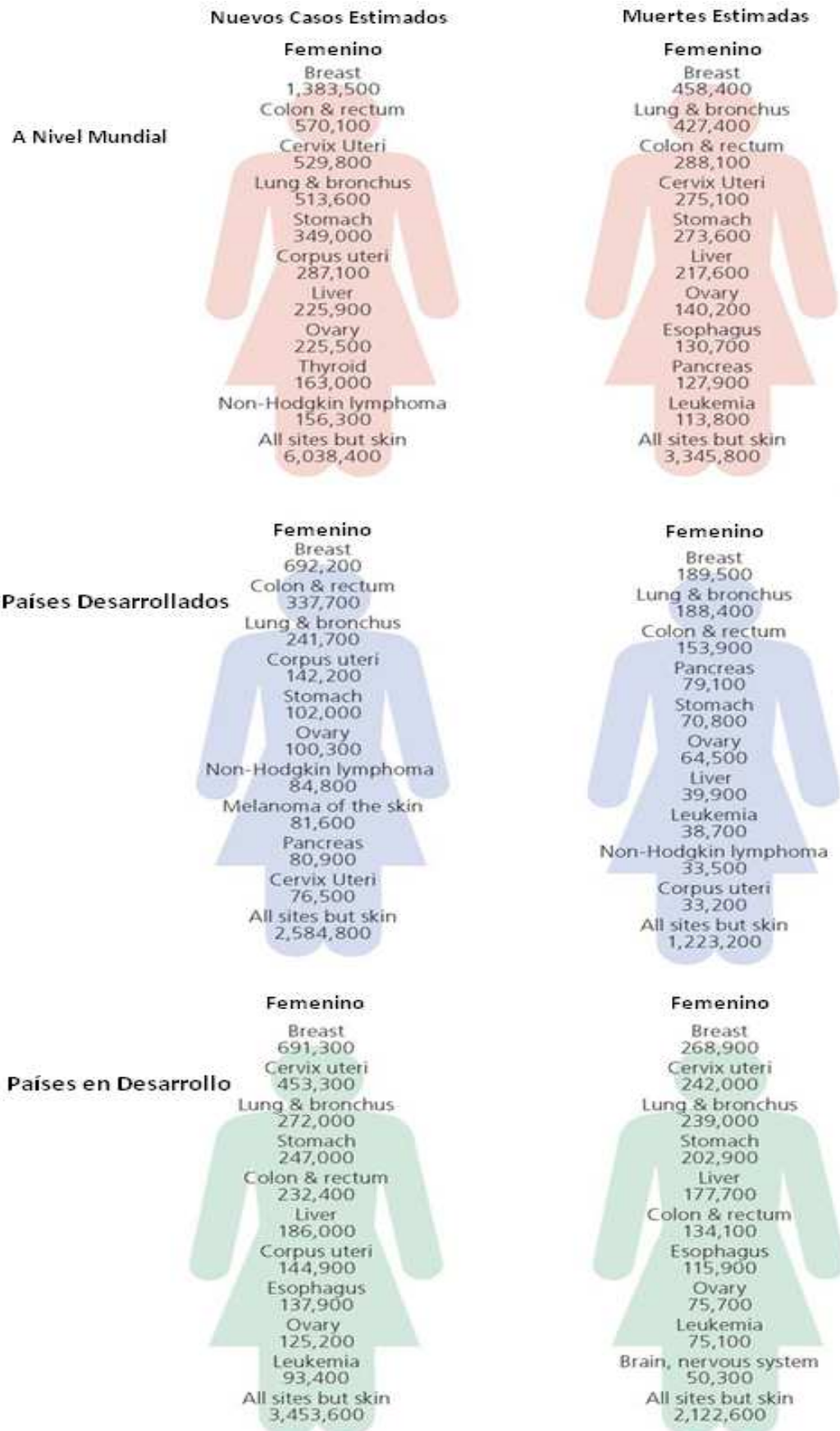


Figura 6. Estimado de nuevos casos de cáncer y muertes a nivel mundial para los tipos de cáncer más importantes por nivel de desarrollo económico, 2008. GLOBOCAN 2008.

Más del 85% de estos nuevos casos y muertes ocurrieron en países en desarrollo. La India es el segundo país con mayor número de casos en el mundo, con un 27% (77, 100) del total de muertes por cáncer cérvicouterino. A nivel mundial el más alto nivel de incidencias es en el este, oeste y sur de África, así como el centro y sur de Asia y sur de América. Los valores más bajo son en el oeste de Asia, Australia / Nueva Zelanda, y América del Norte (Figura 7)¹⁸.

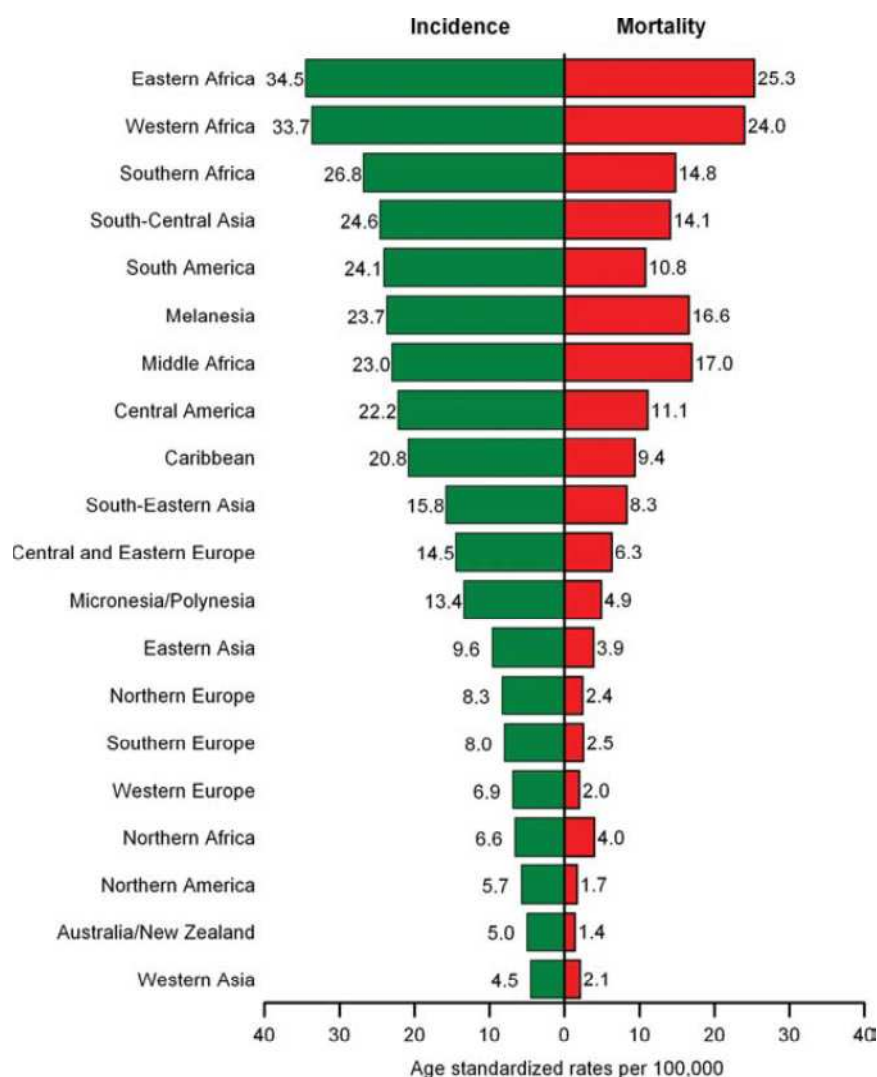


Figura 7. Edad estandarizada de incidencia y mortalidad para cáncer cervicouterino. GLOBOCAN 2008.

En México el Cáncer Cérvicouterino es una de las principales causa de muerte en mujeres de 35 a 59 años, mueren alrededor de 5, 000 mujeres cada año. La tasa de mortalidad que se atribuye al Cáncer Cérvicouterino en el país se ha mantenido estable durante las últimas 3 décadas, con alrededor de 17

muerdes por cada 100, 000 mujeres¹⁹. En México, se presentaron 12,512 nuevos casos²⁰.

1.2.1.2 Factores de Riesgo del Cáncer Cérvicouterino.

Estudios epidemiológicos han demostrado que solo una pequeña fracción de mujeres con infección de VPH de alto riesgo progresa a una LEIAG y CaCu. Esto se debe a que la infección por VPH es necesaria pero no suficiente para causar CaCu, se ha asumido que otros factores en conjunto con VPH, modulan el riesgo de transición de infección por VPH en cérvix a lesión cervical o CaCu²¹.

Por otro lado la inmunosupresión representa un factor de riesgo para la persistencia y progresión de lesiones, pero el factor que determina la persistencia viral en las mujeres no está completamente definido²². Por ello se sugiere que, otros factores afectan directamente en la persistencia viral:

- ❖ Alto número de parejas sexuales: existe una asociación entre el número de parejas sexuales que ha tenido tanto la mujer como su compañero a lo largo de su vida y la infección por VPH.²⁵
- ❖ Uso de Anticonceptivos Orales: Una región del genoma viral (la región ORF), se activa por las hormonas esteroidales (componentes de los anticonceptivos orales).²⁵
- ❖ Edad: Ya que la infección es más común en mujeres sexualmente activas, de 18 a 30 años de edad, después de los 30 años decrece la prevalencia, el CaCu es más común después de los 35 años, lo que sugiere infección a temprana edad y progresión lenta a cáncer²⁵.
- ❖ Alto número de embarazos y partos: Se ha demostrado que mujeres con más de 7 embarazos completos (partos) incrementa el riesgo de desarrollar CaCu.
- ❖ Tabaquismo: Los carcinógenos procedentes del consumo del tabaco (nicotina y cotina), al ser transportados por el sistema circulatorio y llegar al epitelio cervical, puedan iniciar o actuar como carcinógenos en las células ya infectadas por VPH. Así como la inducción indirecta de

inmunosupresión y la reducción de antioxidantes provenientes de la dieta²³.

- ❖ Alcoholismo: La ingestión crónica de alcohol produce alteraciones del sistema de oxido-reducción y modificaciones bioquímicas²⁴.
- ❖ Actividad sexual a temprana edad.
- ❖ Inicio de la menarca a temprana edad.
- ❖ Estatus socioeconómico.
- ❖ Predisposición genética.

1.3 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

El virus del papiloma humano es un virus de doble cadena de DNA circular, su genoma contienen entre 6800 a 8000 pb. Hay tres marcos de lectura abierta y una región de regulación. Los genes del VPH son designados como E o L de acuerdo a su expresión en la etapa de diferenciación ya sea temprana o tardía en el epitelio: E1, E2, E5, E6 y E7 se expresan a principios de la diferenciación, E4 se expresa a lo largo de la diferenciación; L1 y L2 se expresan durante las etapas finales de la diferenciación. El genoma viral se mantiene en la capa basal del epitelio, donde la infección por VPH se ha establecido. Proteínas tempranas se expresa en niveles bajos para el mantenimiento del genoma (que aumenta la posibilidad de un estado latente) y la proliferación celular¹⁰.

Como las células epiteliales basales se diferencian, el ciclo vida del virus pasa a través de etapas de amplificación del genoma, de ensamblaje, y de liberación; con un cambio correspondiente en los patrones de expresión de los genes tempranos a finales¹⁰. Figura 8.

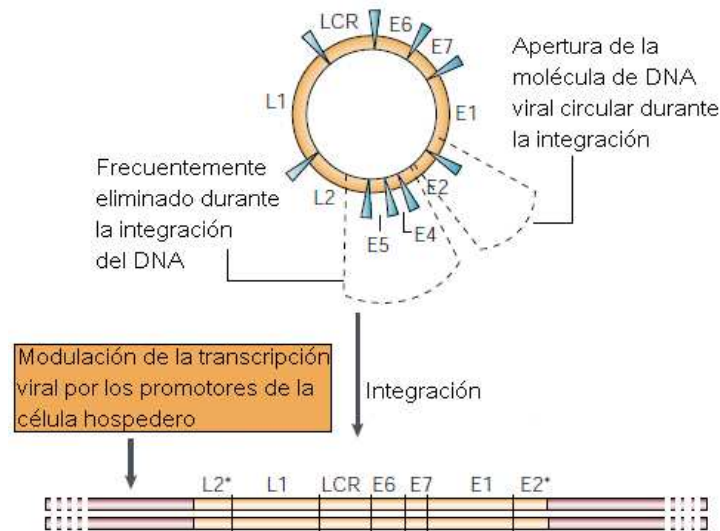


Figura 8. Organización del DNA circular de VPH y su integración al DNA de la célula hospedero. El VPH está dividido en 8 regiones de lectura abierta- E6, E7, E5, E4, E2, E1, y L1 y L2- denominada “E” por early (del inglés y se traduce como temprana) y “L” por late (tardía). En el desarrollo de CaCu la molécula viral se integra al DNA de la célula hospedero. El anillo se abre en el marco de lectura de E2, interrumpiendo la continuidad del gen. Parte de E2, E4, E5 y parte de L2 son eliminados después de la integración (marcados con un asterisco partes de estos genes). LCR, Región larga de control, que no contiene marco de lectura alguno. Referencia 22.

El VPH infecta células de epitelio escamoso, induciendo lesiones proliferativas. Tiene predilección por infectar tejido cutáneo y superficie escamosa de la mucosa interna. Se han identificado 130 tipos virales de VPH, y se pueden dividir en dos grupos, de alto y bajo riesgo, dependiendo de su potencial oncogénico. Teóricamente el 100% de los CaCus tiene infección por VPH de alto poder oncogénico²⁶.

Los tipos virales de alto riesgo están comúnmente asociados al desarrollo de cáncer ano-genital incluido el de cérvix, mientras que las infecciones por tipos de bajo riesgo producen solamente verrugas genitales. Los tipos de alto riesgo incluyen a VPH: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82, 26, 53, 66, mientras que los de bajo riesgo incluyen a VPH: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81^{27, 28}.

1.3.1 VPH y su relación con las Lesiones del Cérvix Uterino.

La infección por VPH se transmite principalmente por contacto de piel a piel o mucosa a mucosa¹⁰. La infección requiere la disponibilidad de una capa de células basales. Esto ocurre generalmente en microlesiones de la piel o la mucosa. La célula infectada se divide y la población se extiende lateralmente. Algunas partículas virales derivadas de la infección, migran a las capas de células diferenciadas suprabasales, donde los genes virales se activan, el DNA viral se replica y las proteínas de la cápside se forman. La formación de partículas virales sobreviene. Las partículas se liberan en la superficie y luego podría infectar a otros tejidos²². Figura 9.

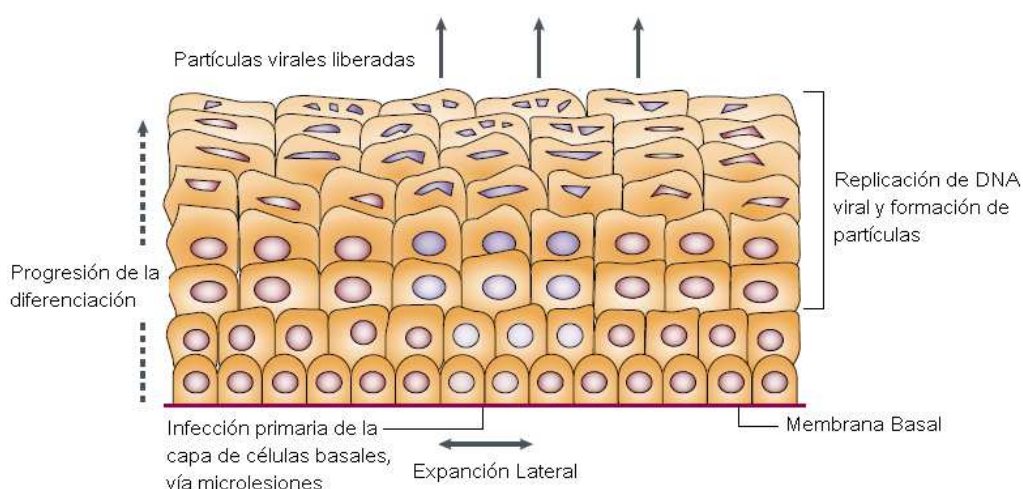


Figura 9. Ciclo de vida del Virus del Papiloma Humano. Infección, Replicación y Liberación. Referencia 22.

El resultado de la infección por VPH puede ser una verruga o papiloma. Las verrugas genitales, o condilomas, se transmiten por contacto sexual, el 90% de estas son causadas por los tipos 6 y 11²⁵.

Los VPH tanto de alto como de bajo riesgo pueden provocar lesiones de bajo grado, un pequeño porcentaje, sin embargo, persiste y progresa a una lesión de alto grado y cáncer invasor. Figura 10.

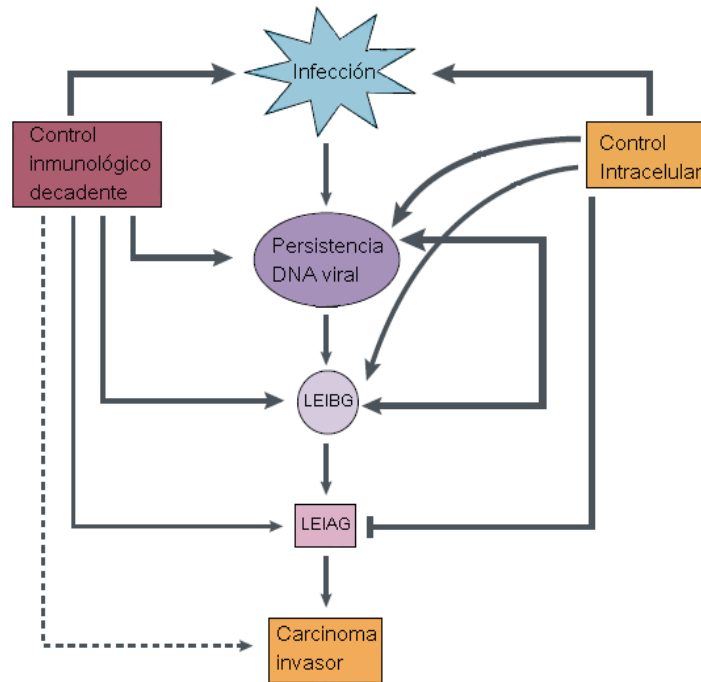


Figura 10. Control de la célula hospedadora que interfiere con la progresión inducida por VPH.

Referencia 22.

La literatura indica que aproximadamente la regresión de una LEIBG es del 60%, persistencia del 30%, progresión a LEIAG 10% y progresión a invasión 1%. La correspondencia para LEIAG es regresión 33%, persistencia 40% e invasión 12%. Los tipos virales VPH 16 y 18 se han encontrado en un 50 a 80% en LEIAG, mientras que en un 90% en cáncer invasor²⁹.

1.3.2 Tipos virales y su Frecuencia.

La prevalencia de la infección cervical por VPH en mujeres varía enormemente en todo el mundo, y está estrechamente relacionado con el correspondiente riesgo de cáncer de cuello uterino³⁰. Los tipos de VPH se han subdividido en tipos de bajo riesgo, que se encuentran principalmente en las verrugas genitales, y los de alto riesgo, que con frecuencia están asociados con el cáncer invasivo de cuello uterino²⁷.

Por otra parte, el número de supuestos tipos de alto riesgo varía de 13 a 19, y sólo 11 tipos de VPH (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 y 58) son consistentemente clasificados como de alto riesgo²⁷. Los VPH bajo riesgo en el

estado de los seis tipos ampliamente considerado como tal (tipos 6, 11, 40, 42, 43 y 44) y se añade a esta lista los tipos 54, 61, 70, 72, 81³⁰. Figura 11.

	Single infection	Multiple infection	Total*	Women*	HPV-positive women*
HPV-negative	-	-	14 184	90.8%	
HPV-positive	1041	388	1429	9.2%	100.0%
High-risk HPV-positive	609	346	955	6.1%	66.8%
Low-risk HPV-positive only	354	42	396	2.5%	27.7%
HPVX	78	0	78	0.5%	5.5%
High-risk HPV†					
16	187	95	282	1.8%	19.7%
58	40	69	109	0.7%	7.6%
31	41	66	107	0.7%	7.5%
18	45	58	103	0.7%	7.2%
56	62	39	101	0.6%	7.1%
35	27	58	85	0.5%	5.9%
33	26	57	83	0.5%	5.8%
45	29	51	80	0.5%	5.6%
52	42	34	76	0.5%	5.3%
39	27	35	62	0.4%	4.3%
51	35	22	57	0.4%	4.0%
59	23	18	41	0.3%	2.9%
68	5	25	30	0.2%	2.1%
73	6	6	12	0.1%	0.8%
82	6	5	11	0.1%	0.8%
High risk‡	8	3	11	0.1%	0.8%
Low-risk HPV†					
42	76	58	134	0.9%	9.4%
81	54	35	89	0.6%	6.2%
70	43	20	63	0.4%	4.4%
66	41	17	58	0.4%	4.1%
40	15	28	43	0.3%	3.0%
72	27	10	37	0.2%	2.6%
43	4	31	35	0.2%	2.4%
Low risk‡	10	4	14	0.1%	1.0%
44	3	7	10	0.1%	0.7%
55	3	7	10	0.1%	0.7%
26	3	4	7	<0.1%	0.5%
61	2	2	4	<0.1%	0.3%
57	1	0	1	<0.1%	0.1%
71	1	1	2	<0.1%	0.1%
Total infections	1041	962	2003		

*Same woman can be counted more than once because of multiple infections. †In decreasing order of prevalence. ‡In Colombia, 25 infections tested positive for high or low risk probe cocktail, but were not subsequently genotyped.

Figura 11. Tipos específicos del VPH prevalencia en 15,613 mujeres sin anomalías cervicales en las encuestas de prevalencia del VPH IARC. Referencia 30.

En lo que respecta a la frecuencia de VPH 16 se ha encontrado que es muy diferente en distintas regiones a nivel mundial. Figura 12

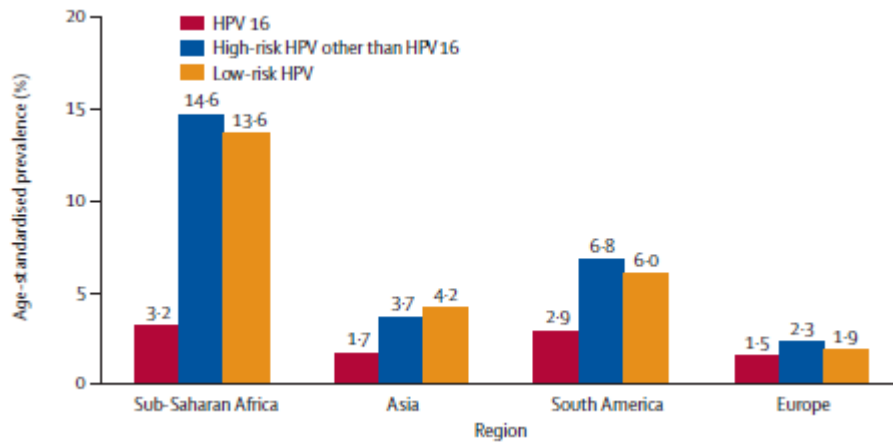


Figura 12. Estandarización por edad de frecuencias de tipos de VPH. Referencia 30.

La proporción de alto riesgo, las infecciones por VPH pueden prevenirse mediante una vacuna para el VPH 16 o VPH 18 puede variar según la región. Sin embargo, la heterogeneidad regional disminuye al aumentar la gravedad de las lesiones, como vemos VPH16 se convierte cada vez más dominante. Sin embargo, de acuerdo las diferencias regionales, sigue siendo evidente los casos de cáncer de cuello uterino que están asociadas con VPH16³⁰.

2. JUSTIFICACIÓN

El Banco de Tejidos actualmente es una herramienta básica fundamental en la investigación, principalmente en el estudio del cáncer. El análisis de tejidos y la información clínica es relevante para la investigación al facilitar el uso de muestras, que permitirán mejor entendimiento del cáncer y qué opciones de tratamiento tienen probabilidades de ser eficaces, al proporcionar la asociación de la información clínica y el resultado de la investigación.

Por consiguiente el desarrollo de bancos de tejidos a nivel nacional se vuelve indispensable en el estudio del cáncer. El cáncer de cérvix al ser un problema de salud pública a nivel mundial, así como en México ocupando el segundo lugar de mortalidad por cáncer en el 2008, convierte su estudio en algo fundamental. Siendo que no existe en México una instalación que ayude (apoye) la investigación en esta área, es indispensable la conformación y descripción de un Banco de Tejidos de Lesiones cervicales.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL.

Conformar y describir estadísticamente un Banco de Tejidos cervicales en mujeres mexicanas.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Colectar tejidos del cérvix normal y con lesión.
- ❖ Crear una base de datos con las Historias clínicas de las pacientes que presentaron lesiones de cérvix.
- ❖ Determinar para el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la presencia de secuencias virales de virus de papiloma humano en tejido de cérvix con lesión.
- ❖ Identificar tipos virales por medio del kit INNO-LiPA.
- ❖ Evaluar las frecuencias de los tipos virales de virus de papiloma humano asociados a las diferentes lesiones cervicales en el Banco de Tejidos de cérvix de Mujeres Mexicanas.
- ❖ Hacer la asociación de los datos clínicos y los tipos de lesiones dentro del Banco creado.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

La colección de las muestras se planeó de acuerdo a las necesidades primarias del Banco de Tejidos. Figura 13.

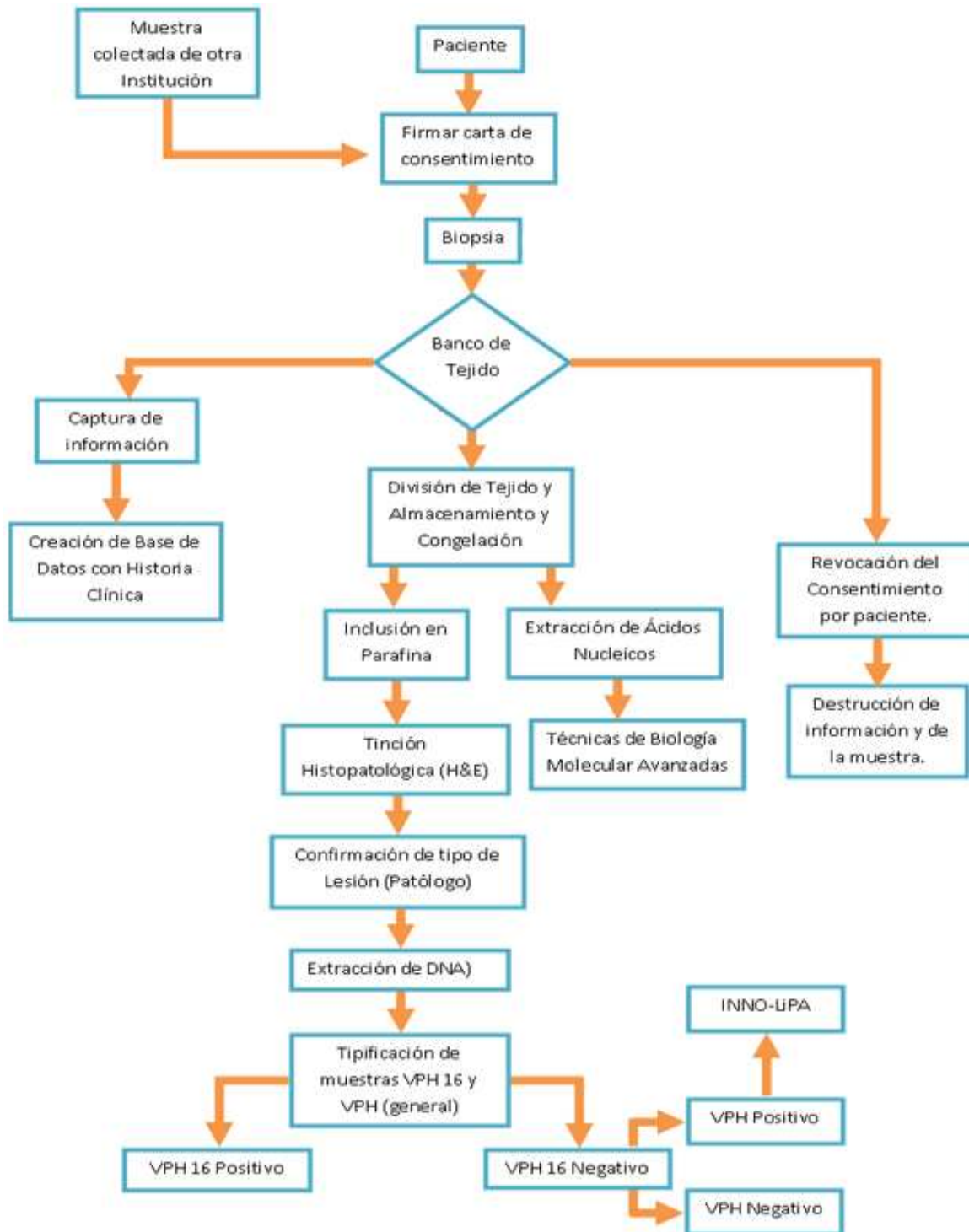


Figura.13. Algoritmo del proceso de toma y procedimiento de muestras para el Banco de Tejidos.

4.1 POBLACIÓN A ESTUDIAR

En el siguiente estudio se colectaron 145 biopsias de cérvix uterino para el Banco de Tejidos (se tiene contemplado llegar a 500 muestras), en mujeres diagnosticadas por colposcopia como Sanas sin lesión, con Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado (LEIBG), Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado (LEIAG) y Cáncer de Cérvicouterino (CaCu), las cuales fueron atendidas en la Clínica de Displasias y el Hospital de Ginecología del Hospital General de México, dicha colección fue comprendida entre los años 2008 al 2010.

El estudio abarca un rango amplio de edad que va desde los 21 hasta los 83 años, de todas las razas y de todas las regiones de la República Mexicana, sin importar estatus social o etnia siempre y cuando se cumplieran los criterios de exclusión. Así mismo fue recabada información clínica de las pacientes como lo es la edad, escolaridad, número de gestas y partos, edad de la menarca y menopausia, inicio de vida sexual, número de parejas sexuales, métodos anticonceptivos, tabaquismo, alcoholismo, antecedente de familiar con cáncer.

4.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

Para el presente estudio se consideró como excluyente que las pacientes:

- ❖ Tuvieran algún tratamiento previo (Cono, ASA)
- ❖ Que presentara algún otro cáncer o tumor maligno primario.
- ❖ Tratamiento anterior con Quimioterapia y Radioterapia, por cáncer o tumor maligno primario.
- ❖ Previa infección por VPH.

4.3 COLECCIÓN DE MUESTRAS.

Se tomaron 2 biopsias por cada paciente, una para conservación de ácidos nucleicos (para técnicas de biología molecular avanzada) y la otra para inclusión en parafina de la cual se realizará la extracción de DNA y posterior tipificación del virus de papiloma humano (VPH).

Las muestras (Biopsias) son transportadas inmediatamente después de la extirpación al Banco de Tejidos en el medio adecuado para su preservación y así asegurar la integridad de ácidos nucleicos. La muestra destinada a la conservación de ácidos nucleicos es congelada y almacenada a -70°C en un ultracongelador (Revco). La otra muestra después se incluye en parafina para obtener los cortes histopatológico necesarios, hacer la tinción de ellos y obtener el diagnóstico histopatológico para confirmar la lesión.

El control de calidad es desarrollado a cada una de las muestras, por medio de la amplificación de una región mitocondrial constitutiva y así asegurar que el DNA es amplificable.

4.3.1 Carta de Consentimiento informado.

Todo el procedimiento descrito fue anteriormente aprobado por el comité de ética de la coordinación de investigación en salud (CNCI) así como por los servicios de ginecología y clínica de displasia del Hospital General de México, y todas la muestra (biopsias) fueron tomadas bajo el consentimiento informado de las pacientes; el propósito y procedimiento del estudio fue explicado a las pacientes con el fin de evitar problemas o malos entendidos hacia la institución o con la paciente, reiterando a la paciente que en el momento que desea abandonar el estudio o revocar su consentimiento es libre de hacerlo y sin ningún tipo de problema o repercusión.

Ver Anexo I donde se muestra las Cartas de Consentimiento informado que son presentadas a la paciente antes de tomar la biopsia, según el tipo de muestra es la carta a presentar, una es para muestras de pacientes con un diagnóstico identificado y la otra es para muestras pacientes sanas.

4.3.2 Elaboración de un Archivo Clínico de las Pacientes con lesiones de cérvix.

Como anteriormente se mencionó, se colectaron 145 biopsias de cérvix uterino para el Banco de Tejidos en mujeres diagnosticadas por patólogo como Sanas sin lesión, con Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado (LEIBG), Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado (LEIAG) y Cáncer de Cérvicouterino (CaCu), las cuales fueron atendidas en la Clínica de Displasias y el Hospital de Ginecología del Hospital General de México, dicha colección fue comprendida entre los años 2008 al 2010. A todas las pacientes referidas se les hizo una historia clínica con información relevante para posibles estudios en protocolos de investigación, dicha información se almacenó en una base de datos, creando así archivos clínicos para cada tipo de lesión que conforman el Banco de Tejidos.

En esta historia clínica se consideraron evaluar los factores de riesgo asociados en el desarrollo de lesiones cervicales, los cuales se han registrado en la literatura, siendo el principal la infección por VPH. Así mismo el archivo clínico a demás de contener la historia clínica de la paciente se anexa la información obtenida del laboratorio de investigación como es: concentraciones de DNA, RNA e identificación de tipos virales de VPH así como la descripción estadística general del Banco de Tejidos. Ver Anexo I donde se presenta la historia clínica que les fue realizada a las pacientes que aceptaron formar parte del protocolo de investigación.

4.4 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Dos biopsias fueron colectadas de cada una de las pacientes, de las cuales una se destinó para la conservación o extracción de ácidos nucleicos (utilizados en técnicas de biología molecular avanzada) y la otra muestra se dispuso para su inclusión en parafina, en dicha inclusión se deshidrata la muestra, una vez incluida en parafina la muestra es evaluada por un patólogo para así determinar el tipo de lesión, hacer la clasificación y corroborar el diagnóstico correspondiente de cada muestra para continuar con la extracción

de DNA e identificación de tipos virales del Virus de Papiloma Humano (VPH), por medio de PCR punto final y el kit INNO LiPA Genotyping Extra .Figura 14

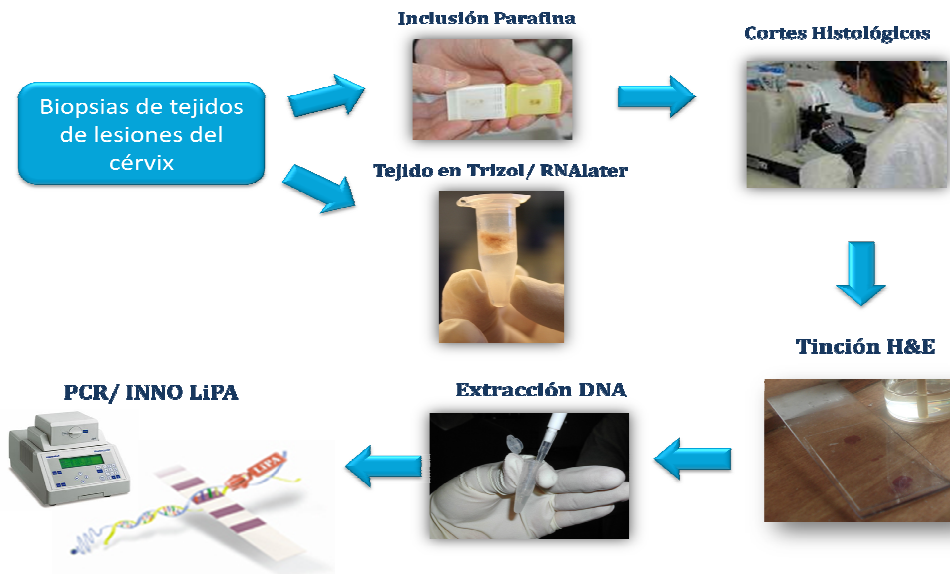


Figura 14. Esquemización del procesamiento general de la muestra posterior a su colección.

En la primera fase de la conformación del Banco de Tejidos, las biopsias destinadas para la conservación de ácidos nucleicos se preservaban en Trizol®, posteriormente se cambió de medio de conservación con el fin de dar prioridad a la preservación de RNA siendo que los protocolos de investigación para el cual el banco fue construido trabajan principalmente con RNA, así que actualmente se preservan en RNAlater®.

Una vez que se obtenían las muestras como ya se ha mencionado estas se procesan por separado según el objetivo para el que estén dispuestas. La biopsia que era destinadas a inclusión en parafina antes de ser incluidas, se les dejaba de 2 a 3 días en solución fijadora para que esta perfunda en el tejido, una vez transcurrido el tiempo en la solución fijadora se prosigue a deshidratar el tejido.

La deshidratación consiste en pasar el tejido por un tren de deshidratación: etanol 70% - formol 4% (solución fijadora), etanol 96%, etanol absoluto (2 veces por tejido) etanol 50% - xilol 50%, xilol y parafina líquida (2

veces por tejido); esto se efectúa en periodos de tiempo de 45 minutos para cada solución en agitación con lo cual logramos que las soluciones penetren en el tejido y así eliminar el agua alcanzando la deshidratación deseada. Figura 15.

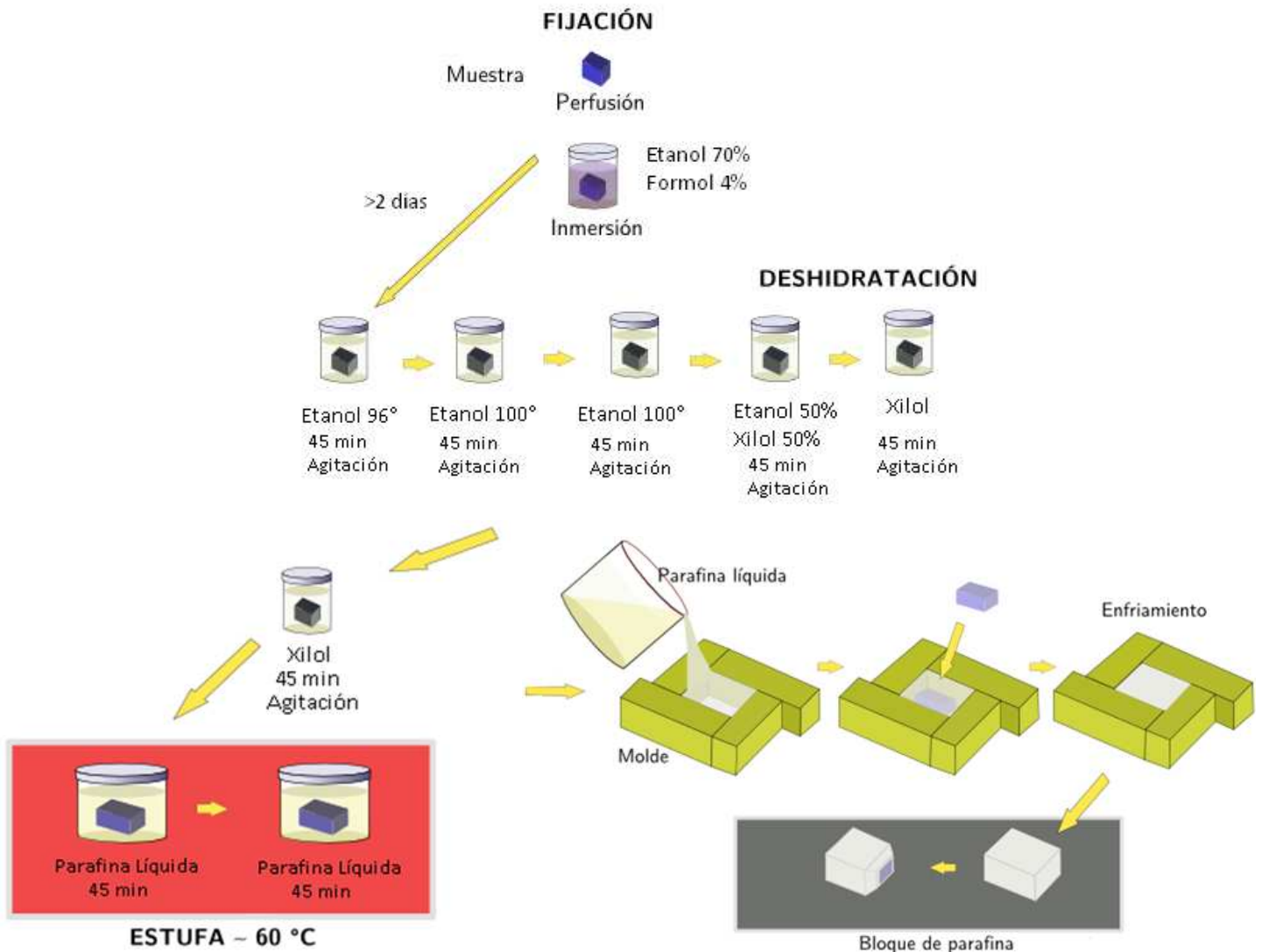


Figura 15. Esquema del proceso de deshidratación de una muestra de tejido para su inclusión en parafina. Referencia 31.

4.4.1 Tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E).

Una vez que el tejido ha sido incluido en parafina, lo que prosigue es hacer los cortes histológicos para realizar la tinción respectiva. Los cortes histológicos se hacen con un Microtomo LEICA RM2125 el cual es un microtomo de rotación de accionamiento manual; los cortes para la tinción son de un grosor de 4 µm.

La técnica que se maneja para este tipo de corte es la siguiente: enfriar los bloques de parafina 30 minutos antes de ser cortados (para esto el microtomo tiene que estar completamente limpio, en especial la navaja), colocar el bloque en el microtomo, ajustarlo y orientarlo de tal modo que el corte a realizar sea parejo y no nos llevemos más tejido de un lado que del otro; otro aspecto que hemos de tener en cuenta antes de empezar a cortar, es la orientación de la cuchilla respecto a la superficie de corte del bloque, lo normal es orientar la cuchilla con un ángulo de unos 10° respecto a la superficie de corte, aunque se puede modificar según nuestras necesidades. Ya habiendo hecho las consideraciones anteriores, proseguimos a cortar el bloque hasta obtener unas tiras de tejido, estas tiras se suelen manipular con pinceles y antes de su fijación definitiva en la superficie de un portaobjetos, han de estirarse para que nuestro tejido quede perfectamente extendido. Aprovechando la hidrofobicidad de la parafina se extienden las secciones inicialmente en el portaobjetos con etanol, luego se colocan sobre agua caliente a unos 35 °C a 40 °C y el calor las hace extenderse sin llegar a su punto de fusión, que está en torno a los 60 °C; se recoge las tiras de tejido con el portaobjetos (este punto es de suma importancia ya que dependerá de esto que sirva o no para su revisión por el patólogo, el tejido debe estar completamente extendido, sin dobleces ni faltantes) y finalmente se deja secar una noche para continuar con la tinción de H&E³¹.

Una vez secos, los portaobjetos con las secciones de tejido están listos para el procesamiento posterior. Figura 16

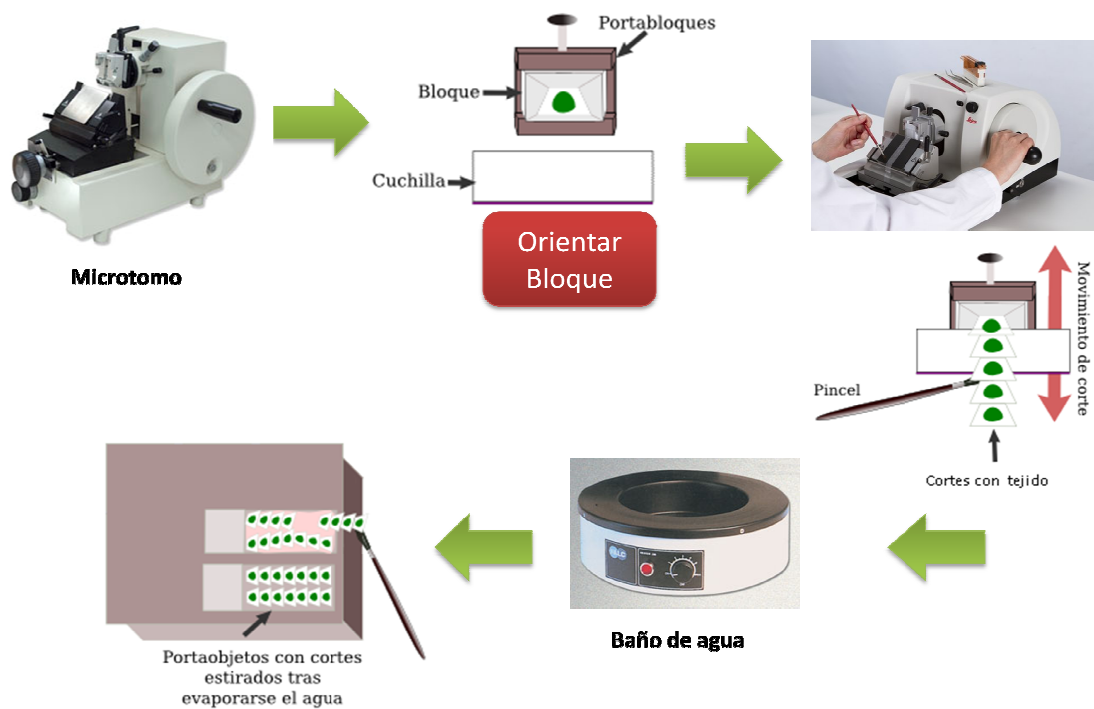


Figura 16. Proceso generalizado para obtener cortes histológico de tejidos incluidos en parafina. Referencia 31

Con las secciones de tejidos adheridas al portaobjetos proseguimos a hacer la tinción histológica, la cual consiste en la aplicación de la tinción de hematoxilina, que por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas en tonos Azul y Púrpura y eosina que tiñe componentes básicos, en tonos de color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida.

El proceso para realizar la tinción hematoxilina-eosina consiste en una serie de pasos que van desde el desparafinado, hidratación, tinción, deshidratación y montaje. El desparafinado permite eliminar el medio de inclusión, la parafina del tejido; esta se realiza de forma inversa a la deshidratación (que se menciona en la inclusión del tejido en parafina). La rehidratación es necesaria puesto que los colorantes utilizados son hidrosolubles. La deshidratación final es necesaria porque el medio de montaje

no suele ser hidrosoluble. Tras el montaje y secado (evaporación del xilol), las secciones se puede observar con el microscopio óptico³¹. Figura 17

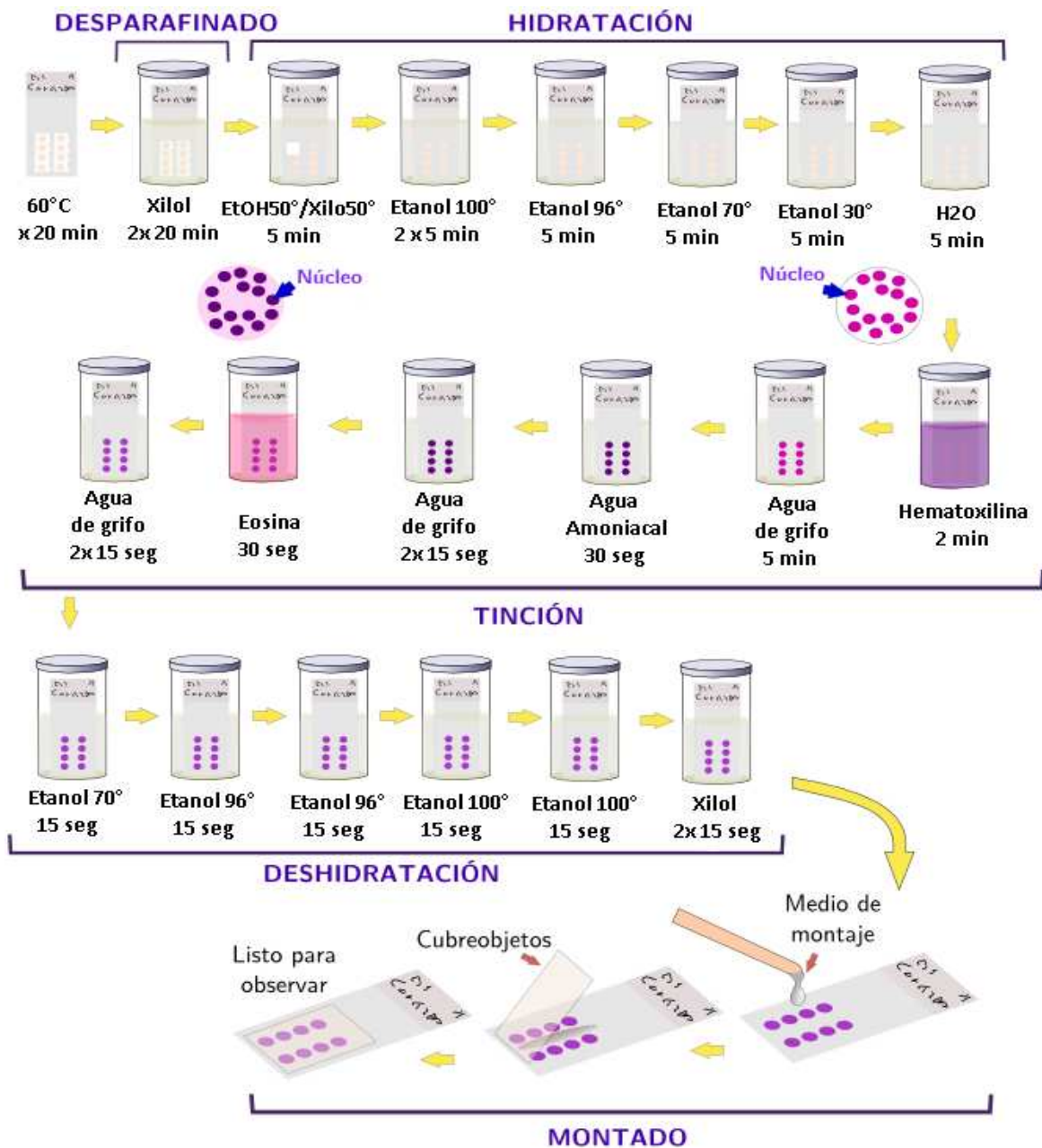


Figura 17. Pasos que durante una tinción general de hematoxilina-eosina. Referencia 31.

4.4.2 Evaluación Histopatológica del Tejido.

Cada una de las lamillas obtenidas se revisó detalladamente con ayuda de un patólogo para corroborar el tipo de lesión que se reportaba y así hacer la clasificación adecuada del tejido dentro del Banco.

4.4.3 Extracción de DNA.

Antes de la extracción de DNA se realizaron nuevos cortes; los cortes para extracción de DNA fueron de 10µm. Se realizó una serie de cortes histológicos de cada bloque (aproximadamente 7 cortes por bloque, esto dependería del tamaño de tejido); el procedimiento de extracción de DNA de los cortes histológicos del bloque de parafina fue llevado a cabo utilizando 1 mL de xilol, calentado a 60°C por 20 minutos en un Ter moblock (Baxter Scitific Products Multi-Blockc) este proceso fue por duplicado, con el fin de eliminar la parafina.

La extracción de DNA se llevó a cabo por la técnica de precipitación con sales de amonio. Las muestras se les agregó 250 µL de buffer de lisis nuclear y 10 µL de proteinasa K se incubaron a 60°C hasta que se observó trasparente la mezcla. Posteriormente se agregaron 300 µL de acetato de amonio incubando la reacción por 5 minutos a -20°C; se centrifugaron a 14, 000 rpm durante 4 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, se añadió 600 µL de isopropanol frío, se agitó y se dejó precipitando el DNA por 1 hora a -20°C; en seguida los tubos se centrifugaron 15 minutos a 14, 000 rpm, se eliminó el sobrenadante; se añadieron 500 µL de etanol 70% con agitación suave, se centrifugó a 14, 000 rpm durante 3 minutos. Finalmente se elimino el sobrenadante y las muestras se dejaron secar para resuspender en 25 µL de agua estéril.

La integridad del DNA se evaluó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se visualizó en un transiluminador de luz UV (Eagle Eye II); además, se cuantificó en el espectrofotómetro (Nanodrop ND1000 Spectrophotometer), para proseguir con la identificación de tipos vires de VPH.

4.5 ESTRATEGIAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN BANCO DE TEJIDOS.

Para detectar la infección por VPH en las muestras se utilizaron dos juegos de “primers” o iniciadores. Inicialmente las muestras fueron sometidas a la detección del tipo viral VPH 16 mediante una PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en ingles) utilizando primers específicos para la región E6 VPH tipo 16; las muestras que salieron negativas a la primera detección fueron sometidas a una segunda reacción ahora utilizando los primers universales GP5+/GP6+, los cuales detectan la región L1 de 28 tipos distintos del Virus del Papiloma Humano (VPH), más sin embargo no nos indica el tipo viral presente en las muestras.

Una vez que se ha identificado que algunas muestras fueron positivas a la presencia de VPH pero sin saber qué tipo viral está presente en ellas, estas mismas muestras fueron sometidas al kit INNO LiPA Genotyping Extra y conocer el tipo viral presente; este kit identifica 28 genotipos de VPH, mediante tiras las cuales al ser reveladas indican el tipo viral presente. A continuación se describe con detalle la técnica.

4.5.1 La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

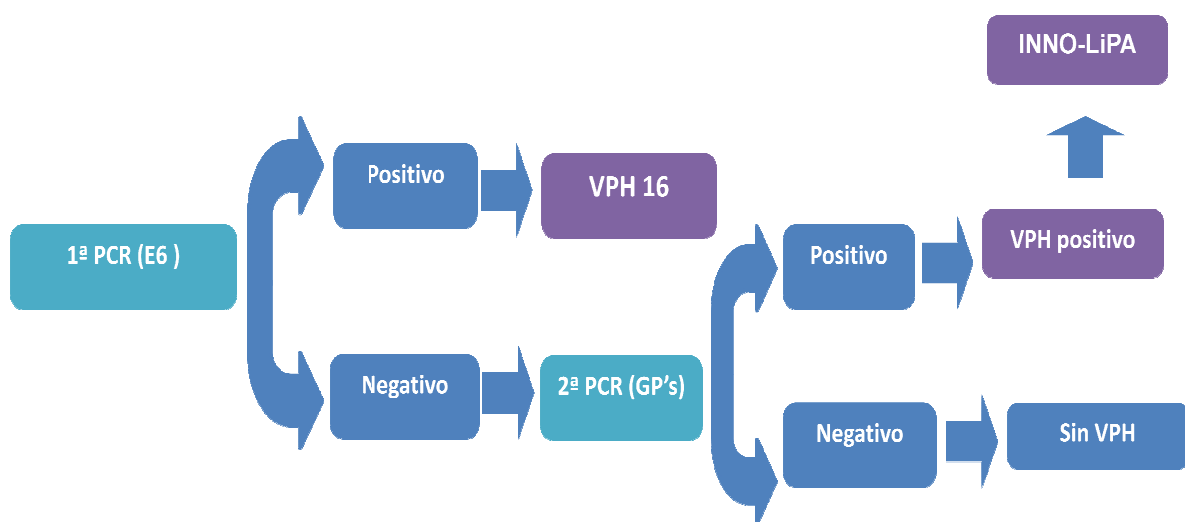


Figura 18. Esquema general del proceso de tipificación viral (VPH) a muestras del Banco de Tejidos.

Las muestras se sometieron a una primera PCR con los primers para la región E6, para ver la infección por VPH 16 con la siguiente mezcla de reacción: buffer con $\text{NH}_4 (\text{SO}_4)_2$ 10X, MgCl_2 25mM, dNTP's 10mM, E6F + E6R 50pmol/uL cada uno, Taq polimerasa 5 U/uL, 100 ng de DNA y agua en un volumen final de 25 μL . El programa del termociclador (Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler 480) se inició a 94°C 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos; 72°C por 5 minutos y un tiempo de espera a 4°C.

Posteriormente, las muestras que fueron negativas a VPH 16 se sometieron a una segunda reacción con los primers GP5+/GP6+ 50pmol/uL con la siguiente composición en la mezcla de reacción: buffer $\text{NH}_4 (\text{SO}_4)_2$ 10X, MgCl_2 25mM, dNTP's 10mM, GP5+/GP6+, Taq polimerasa 5 U/ μL , 100 ng de DNA y agua en un volumen final de 50 μL . El programa del termociclador fue el siguiente: inicia con un precalentamiento a 94°C 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 44°C por 1 minutos, 72°C por 90 segundos; 72°C 10 minutos y un tiempo de espera a 4°C.

Junto con el control interno de la prueba, se hizo una tercera PCR en donde se amplificó una región constitutiva mitocondrial y con esto asegurar que el DNA era amplificable, la composición de la mezcla de reacción fue: buffer con $\text{NH}_4 (\text{SO}_4)_2$ 10X, MgCl_2 25mM, dNTP's 10mM, VANF3 + VANR3 12.5pmol/uL cada uno, Taq polimerasa 5 U/uL, 100 ng de DNA y agua en un volumen final de 25 μL . El programa del termociclador se inició a 94°C 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos. Con esto se eliminan falsos negativos en las pruebas de PCR y se comprobó la calidad del DNA.

En la tabla 2 se muestran la secuencia de los primers utilizados, el tamaño del amplicón que generaron de cada juego de primers.

Primers	Secuencia	Tamaño del amplicón
E6F	5'-CAG GAC CCA CAG GAG CGA CCC-3'	126
E6R	5'-GTC ATA TAC CTC ACG TCG CAG-3'	
GP5+	5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3'	150
GP6 +	5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3'	
VANF3	5'-CGT AC ATTA CTA CCA GCC ACC AT-3'	166
VANR3	5'-GGT GGC TTT GGA GTT GCA GTT G-3'	

Tabla 2. Secuencia y tamaño de amplicón de los primers utilizados en la detección de VPH.

4.5.2 INNO-LiPA.

Se basa en la hibridación reversa. Parte de la región L1 del genoma del VPH es amplificada usando primers SPF10 y los amplicones biotinilados son después desnaturalizados e hibridados con sondas específicas de oligonucleótidos. Un par de primers adicionales para la amplificación del gen HLA-DBP1 es adicionado para monitorear la calidad y extracción de las muestras. El primer SPF10 amplifica una región de 65 bp en la región de lectura abierta para L1 y tiene el potencial de amplificar al menos 54 tipos de VPH.

Pasos generales del kit INNO-LIPA HPV Genotyping Extra:

- ❖ Amplificación del extracto de DNA (reacción de PCR).
- ❖ Hibridación del producto amplificado, seguido de un lavado.
- ❖ Adición del conjugado y sustrato, desarrollo de coloración.
- ❖ Interpretación.

La amplificación se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando primers SPF10, esta reacción se realiza con una mezcla de reactivos que contiene un exceso de deoxinucleosidos 5'trifosfatos (dNTP's) incluyendo deoxiuridina trifosfato, primers biotinilados, DNA polimerasa y uracil-

N-glicosilasa (UNG). La descontaminación paso previo a la amplificación remueve los uracilos de cualquier producto de amplificación contaminada presente en la mezcla de reacción. La enzima UNG es inactivada cuando se incrementa la temperatura en el paso de desnaturalización. La desnaturalización del DNA permite que se abran las dos hebras de la α -helice exponiendo la secuencia blanco a los primers, se producen dos copias exactas biotiladas después de un ciclo de desnaturalización, alineación y extensión. A continuación se muestra las temperaturas para el paso de amplificación: 1) descontaminación 37°C por 10 minutos (degrada los uracilos contenidos en el DNA), 2) desnaturalización 94°C por 9 minutos (inactiva la enzima UNG), 3) Seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos; finalmente un tiempo de espera a 72°C. Al finalizar el ciclaje proseguir con la hibridación.

Todas las sondas se inmovilizan en líneas paralelas sobre tiras de membrana. Después de la hibridación y el lavado astringente, el conjugado de estreptavidina y fosfatasa alcalina es agregado, el cual enlaza cualquier amplicon biotilado previamente formado. La incubación con el cromógeno BCIP/NBT da un precipitado purpura y finalmente se puede interpretar el resultado de las tiras. A continuación se muestra a detalle el proceso de hibridación y lavado.

En un baño de agua caliente con agitación a 49°C, precalentar la solución de hibridación y la solución de lavado astringente; Colocar las tiras en las canaletas y acomodar las canaletas en su base, agregar 10 μ L de solución desnaturalizante en una esquina de la canaleta y pipetear 10 μ L del amplificado biotilado, mezclar cuidadosamente, incubar 5 minutos a temperatura ambiente; agregar 2 mL de solución de hibridación a la canaleta e inmediatamente colocar las canaletas en el baño a 49°C con agitación por 1 hora (la agitación debe ser 80 rpm). Para el lavado astringente, remover la solución de hibridación con una pipeta; agregar 2 mL de solución de lavado astringente previamente calentada a cada canaleta, agitar por 20 segundos a temperatura ambiente y remover el líquido, hacer esto 2 veces; finalmente agregar 2 mL de solución de lavado astringente e incubar en el baño a 49°C

por 30 minutos con agitación. Finalmente para desarrollar el color: lavar las tiras 2 veces con 2 mL de solución Rinsen por 1 minuto, descartar la solución; agregar 2 mL de solución conjugado a cada canaleta e incubar por 30 minutos en baño a 25°C con agitación, eliminar solución; lavar 2 veces con 1 mL de solución Rinsen por 1 minuto y lavar una vez más con 2 mL de buffer de substrato, aspirar solución; agregar 2 mL de solución substrato e incubar por 30 minutos con agitación a 25°C, eliminar líquido; detener el desarrollo de color lavando las tiras 2 veces con agua destilada con agitación de 3 minutos, eliminar agua dejar secar. Remover la tiras pegarlas en la hoja de resultados y proseguir a la interpretación.

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se realizó un análisis estadístico de las diferencias tipos de lesiones y su correlación con parámetros clínico-patológicos utilizando la prueba estadística χ^2 , mediante el programa SPSS V19. Además de calcular la frecuencia de los diferentes tipos virales.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL BANCO DE TEJIDOS DE LESIONES CERVICALES.

Se colectaron 145 biopsias de Lesiones de Cérvix de los años 2008 al 2010 en la Clínica de Displasia y Hospital de Ginecología del Hospital General de México (ubicado en la delegación Cuauhtémoc, Distrito Federal), evaluadas y diagnosticadas como:

- ❖ Tejido Sin Lesión,
- ❖ Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado (LEIBG)
- ❖ Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado (LEIAG)
- ❖ Cáncer Cérvicouterino (CaCu)

Se evaluó la edad, inicio de vida sexual, número de parejas sexuales, número de embarazos, edad de la menarca y menopausia, el uso de anticonceptivos, tabaquismo, alcoholismo, el nivel de estudios y la presencia de VPH.

De las 145 biopsias colectadas, solamente se procesaron 132 muestras; 3 de ellas se excluyeron del análisis por presentar una cantidad mínima de tejido que imposibilitó el análisis; las otras 10 biopsias solo se consiguió estroma impidiendo que el patólogo diera un diagnóstico, por consiguiente no se logró hacer las clasificaciones dentro del banco mismo y tampoco realizar las pruebas de laboratorio.

Basados en el diagnóstico histológico, el Banco de Tejidos de Lesiones cervicales está conformado por: 23 (17.4%) muestras clasificadas Sin Lesión, 20 (15.2%) como Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado (LEIBG), 33 (25%) Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado (LEIAG) y 56 (42.4%) como Cáncer Cérvicouterino (CaCu), de acuerdo a la clasificación Histológica. ver Tabla 3 y Grafico 1.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Sin Lesión	23	17.4	17.4	17.4
CaCu	56	42.4	42.4	59.8
LIEAG	33	25.0	25.0	84.8
LIEBG	20	15.2	15.2	100.0
Total	132	100.0	100.0	

Tabla 3. Grupos de lesiones que conforman el Banco de Tejidos de Lesiones Cervicales, de acuerdo al diagnostico histopatológico.

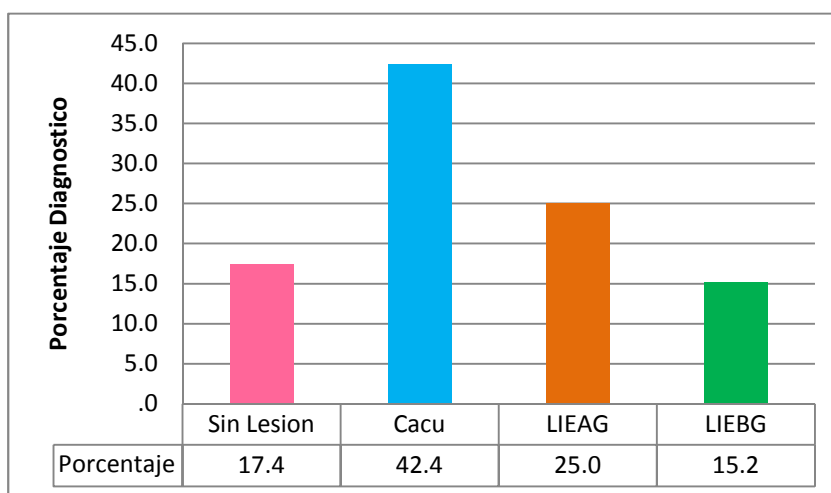


Grafico 1. Representación grafica del porcentaje de cada grupo que conforma el Banco de Tejidos.

De todas las muestras colectadas se obtuvo la firma del consentimiento informado, así como su respectivo archivo clínico, almacenado en una Base de Datos tanto virtual como física.

5.1.1 Edad de la paciente

La edad de nuestras pacientes está comprendida entre los 21 años (las más jóvenes) y los 83 años (la de mayor edad), con una media de 48 años y moda de 40 años. Grafico 2.

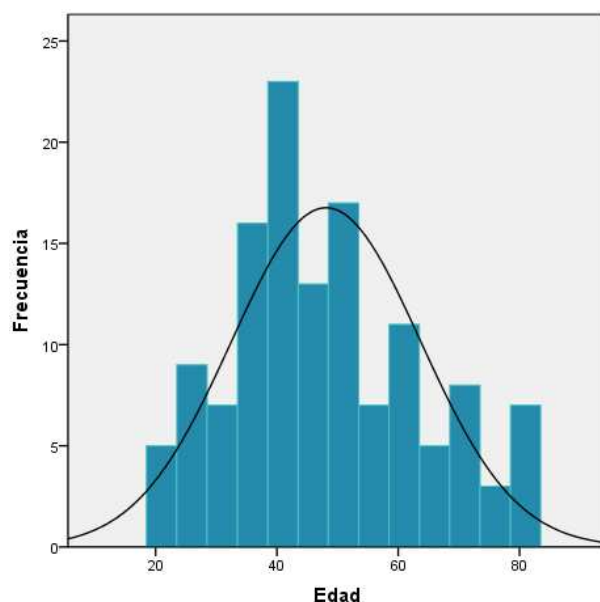


Grafico 2. Histograma de frecuencias en función de la Edad. Media= 48 años.

5.1.2 Escolaridad

La distribución del grado de escolaridad mostró predominio en la educación Primaria con el 46.2%; mientras que la población Sin estudio y con el grado de Secundaria se posicionó en segundo plano con el 18.2% por igual, dejando por ultimo los grados de Preparatorio y Universidad respectivamente; ver Grafico 3.

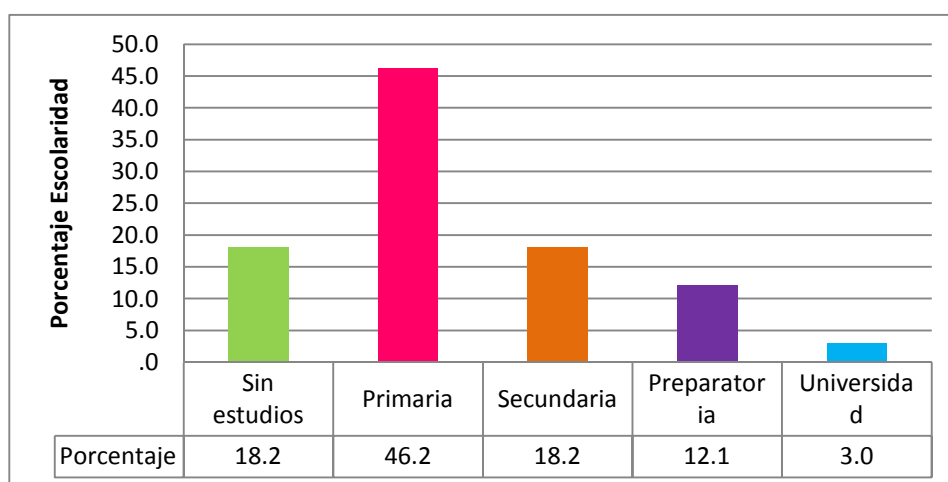


Grafico 3. Representación grafica del porcentaje distribuido de acuerdo al nivel de escolaridad.

5.1.3 Uso de Anticonceptivos

Al evaluar la frecuencia del uso de anticonceptivos en la población del Banco de Tejidos encontramos que la diferencia no es tan grande de las pacientes que usaron anticonceptivos y las que no, donde el 43.9% (58 muestras) no usó anticonceptivos y el 50.8% (67 muestras) si usó anticonceptivos; Grafico 4.

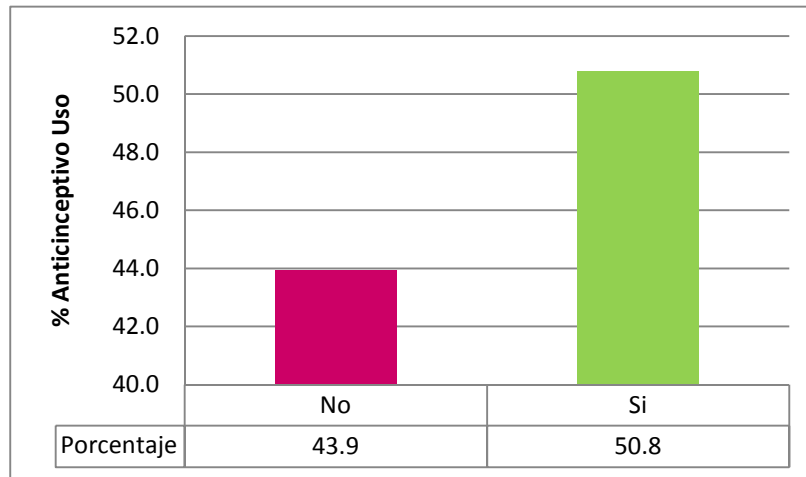


Grafico 4. Representación grafica del porcentaje de pacientes que usaron anticonceptivos.

5.1.4 Número de Embarazos

Al evaluar la frecuencia del número de embarazos encontramos que la media es de 5 embarazos con una moda de 3. Ver Grafico 5.

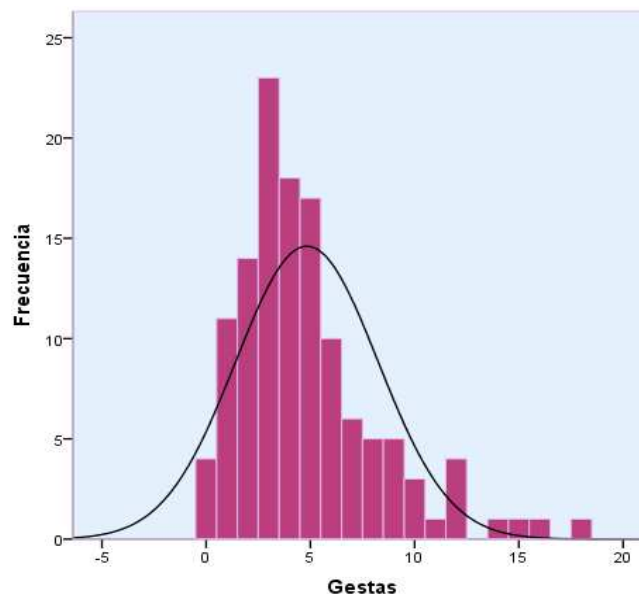


Grafico 5. Histograma de frecuencias del número de embarazos. Media = 5 embarazos.

5.1.5 Número de Parejas sexuales

En lo que respecta al número de parejas sexuales los datos que se presentaron en la población fue una media de 2 parejas sexuales y una moda de 1 pareja sexual, ver Grafico 6. Encontramos que el mínimo fue 1 pareja sexual y el máximo de 15 parejas sexuales.

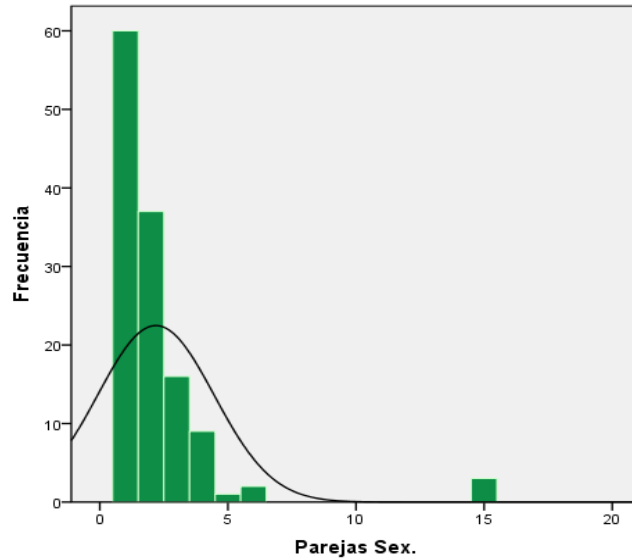


Grafico 6. Histograma de frecuencias del número de parejas sexuales en población. Media =2

5.1.6 Inicio de la Vida Sexual Activa (IVSA)

En la distribución del número del Inicio de Vida Sexual Activa (IVSA), encontramos que la media fue de 18 años con una moda de 17 años; con una edad mínima 10 años y la máxima de 35 años, ver Grafico 7

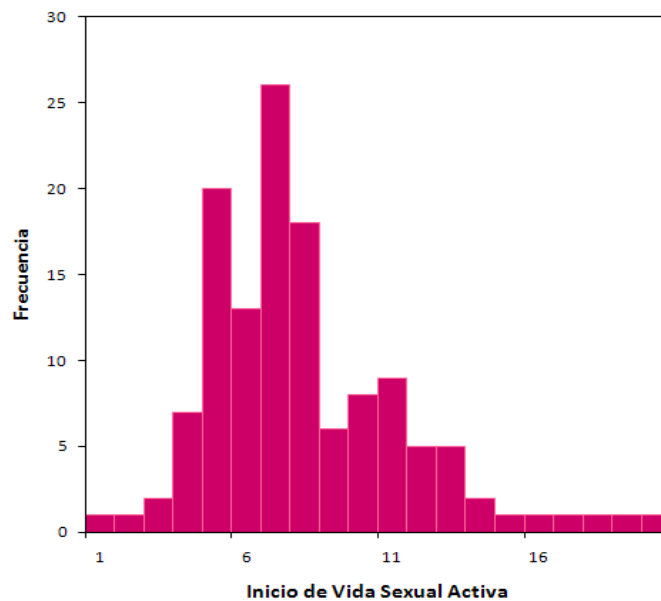


Grafico 7. Histograma de frecuencia del Inicio de Vida Sexual Activa (IVSA).

5.1.7 inicio de la Menarca y Menopausia

Para la información de la edad en que se presentó la menarca, la media y moda de 13 años; por otro lado la media de edad de menopausia fue de 46 años con una moda de 40 años, ver Gráfico 8.

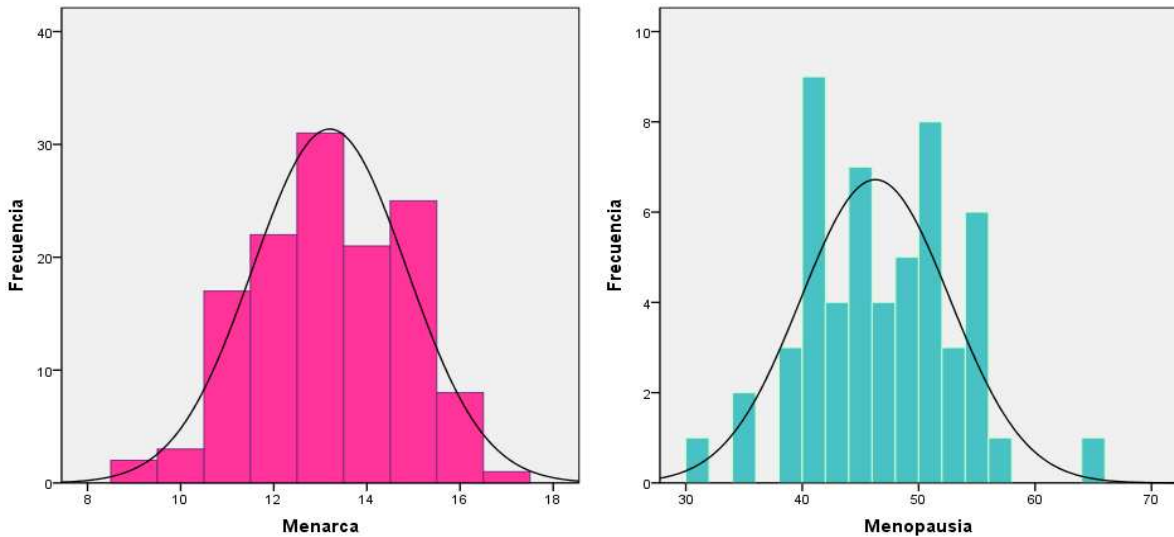


Gráfico 8. Histogramas de la frecuencia de edad para la Menarca y Menopausia respectivamente.

5.1.8 Efecto del Tabaquismo y Alcoholismo

En lo que respecta al Tabaquismo y Alcoholismo encontramos que en su mayoría las pacientes no fumaban y no ingerían alcohol, lo cual se aprecia muy bien los Gráficos 9 y 10 respectivamente.

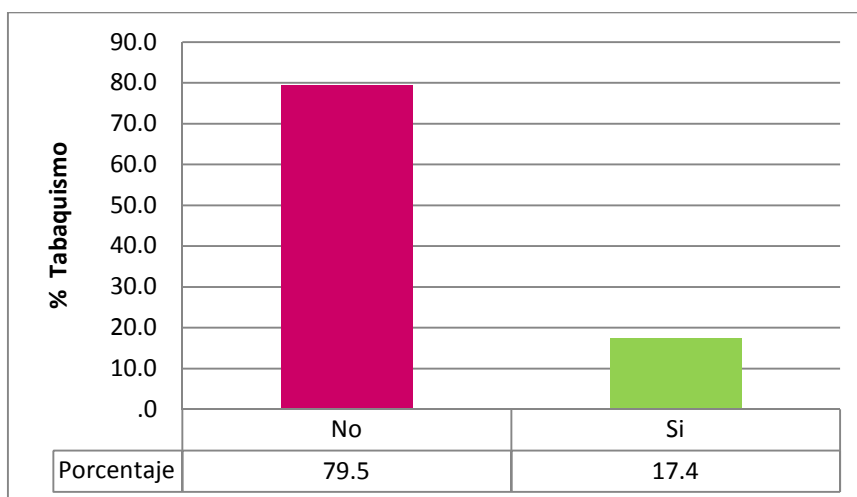


Gráfico 9. Porcentaje de pacientes que fuman.

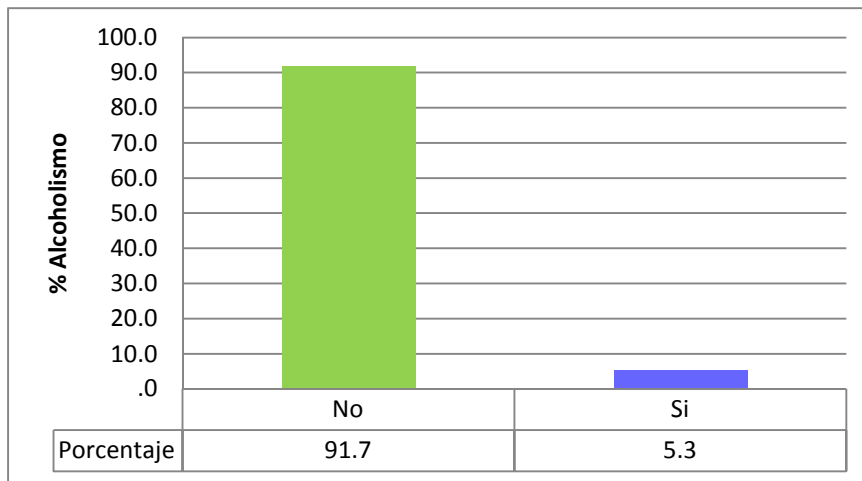


Grafico 10. Porcentaje de Pacientes con ingesta de alcohol.

5.2 HISTOLOGÍA

Después de la inclusión del tejido en parafina, se realizó la tinción en Hematoxilina y Eosina (H&E) a cortes histológicos obtenidos de los diferentes tipos de lesiones que conforman el Banco de Tejidos. Figura17. Dichos cortes fueron evaluados por un patólogo; posterior al diagnóstico histopatológico, se hizo la clasificación de las muestras en el Banco de Tejidos, según el grado de la lesión o en el caso de los tejidos sin lesión se comprobó microscópicamente el respectivo diagnóstico.

El Banco de Tejido se clasificó en 4 grupos: tejidos Sin Lesión, tejidos con LEIBG, tejidos con LEIAG y tejidos con Cáncer Cérvicouterino. En la Figura 19 se pone como ejemplo representativo algunas tinciones H&E hechas a muestras que conforma el Banco de Tejidos; en la Figura 19A: se observa la muestra con nomenclatura QN1, la cual se diagnosticó histopatológicamente como tejido Sin Lesión, vemos células maduras, sin pérdida de la polaridad; en la Figura 19B: tenemos la tinción de la muestra LEIBG 9 diagnosticada con Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado, se observan coilocitos, alargamiento nuclear y células displásicas en el inferior del epitelio, hiper cromasia; Figura 19C: podemos observamos la muestra LEIAG 19 diagnosticada como LEIAG, donde hay hiper cromasia, perdida de la polaridad celular, proliferación de células inmaduras, coilocitos, núcleo abarca casi toda la célula y por ultimo en la Figura 19D: se encuentra la muestra CACU 11

diagnosticada como Carcinoma Invasor, en donde observamos que las células infiltran el estroma, no hay capa basal y sin una estructura ordenada.

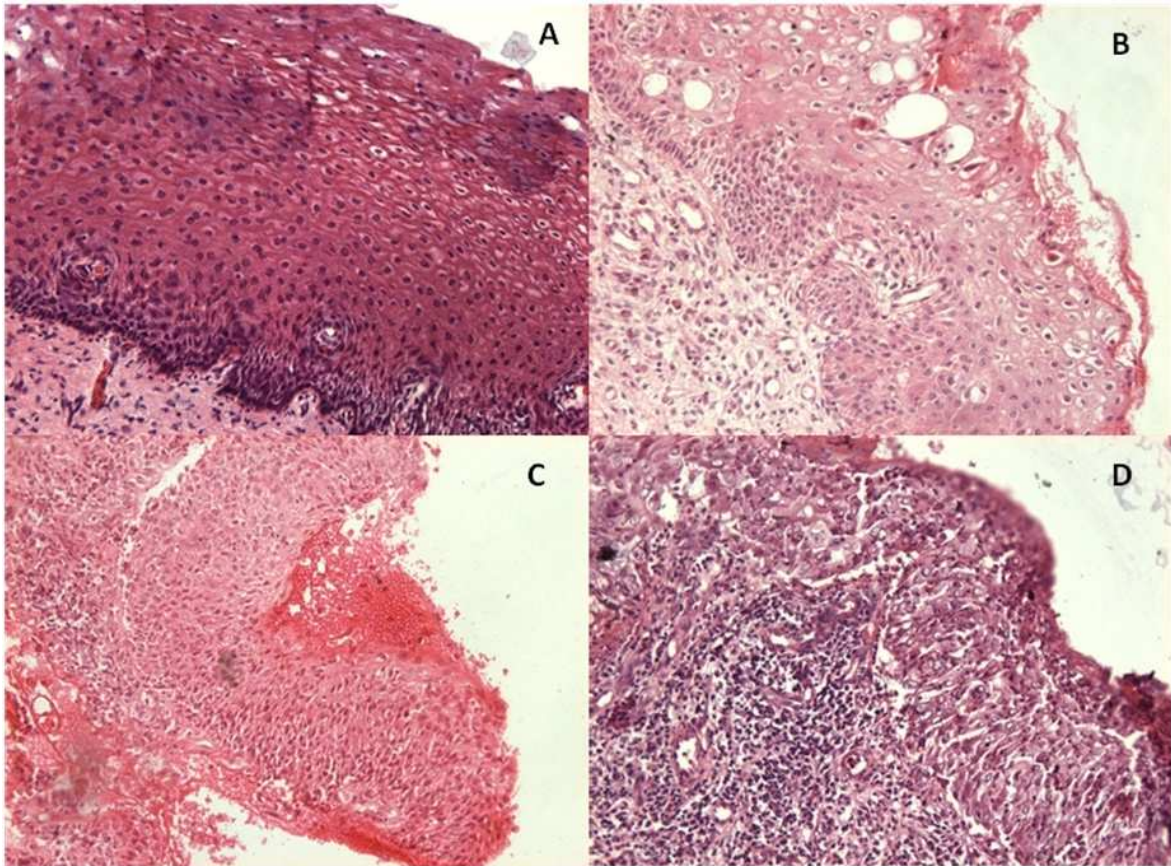


Figura19. A: Tejido Sin Lesión (Hematoxilina & Eosina 40X). B: Tejido con LEIBG (Hematoxilina & Eosina 40X). C: Tejido con LEIAG (Hematoxilina & Eosina 20X). D: Tejido con Cáncer Cérvicouterino (Hematoxilina & Eosina 40X).

Este proceso de tinción, diagnóstico y clasificación, se realizó a las 132 muestras; la histología más frecuente fue la de Cáncer Cérvicouterino con el 42.4%, seguida por lesiones LEIAG con 25%, en tercer lugar encontramos el 17.4% de muestras Sin Lesión y finalmente el 15.2% como Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado. Tabla 3 y Grafico 1.

5.3 DETECCIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO.

Una vez clasificada la muestra dentro del Banco de Tejidos, proseguimos a la extracción de DNA por medio de la técnica de precipitación por sales de amonio, esta extracción fue de cortes histológicos; se cuantificó en un Nanodrop. Dependiendo del tamaño de la biopsia, se obtuvieron diferentes rendimientos de DNA que oscilaron desde 50 ng/μL hasta 2725 ng/μL. En cuanto a la pureza obtenida, se obtuvo en promedio que la relación 260/230 fue de 1.80.

La detección de la infección viral por VPH, se realizó con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando de 100 a 200 ng/μL de DNA. Se emplearon los primers para VPH 16 que amplifican la región E6 del virus. Se realizó el electroferograma en gel de agarosa al 2%. El amplicón obtenido tenía un PM de 126 pb. Figura 20

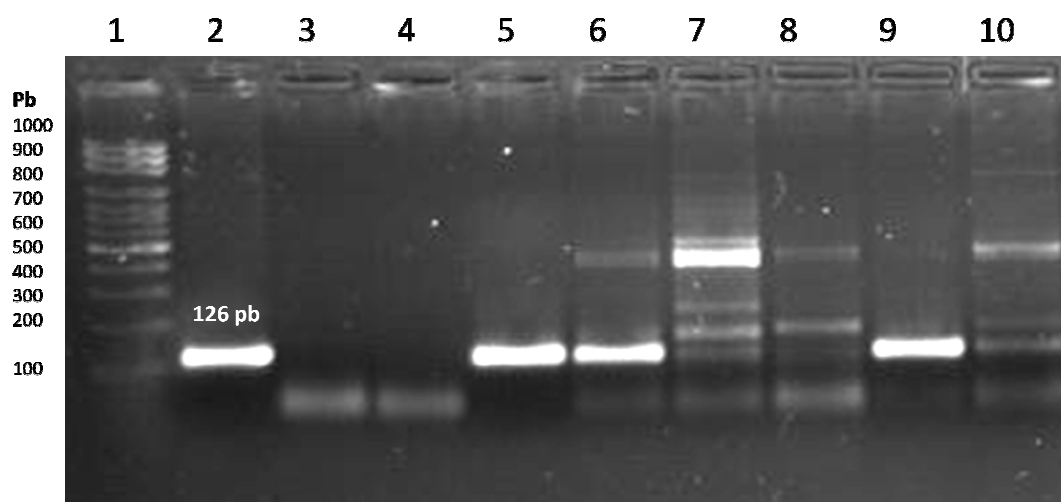


Figura 20. Electroferograma para visualizar los productos de PCR que amplificaron para la infección por VPH 16. **Pozo 1:** Marcador de peso molecular; **Pozo 2:** Control Positivo para VPH 16 (línea celular Caski); **Pozos 3 y 4:** Control Negativo; **Pozos 5, 6, 7, 9 y 10:** Muestras positivas para VPH 16; **Pozo 8:** Muestra negativa para la presencia de VPH 16.

Así mismo todas las muestras se sometieron a otra reacción de PCR; la amplificación de una región mitocondrial como control interno, para asegurar que el DNA es amplificable y los resultados son fiables. La Figura 21 muestra los productos de PCR para región mitocondrial de las mismas muestras que se mostraron anteriormente para detección de la presencia de VPH 16.

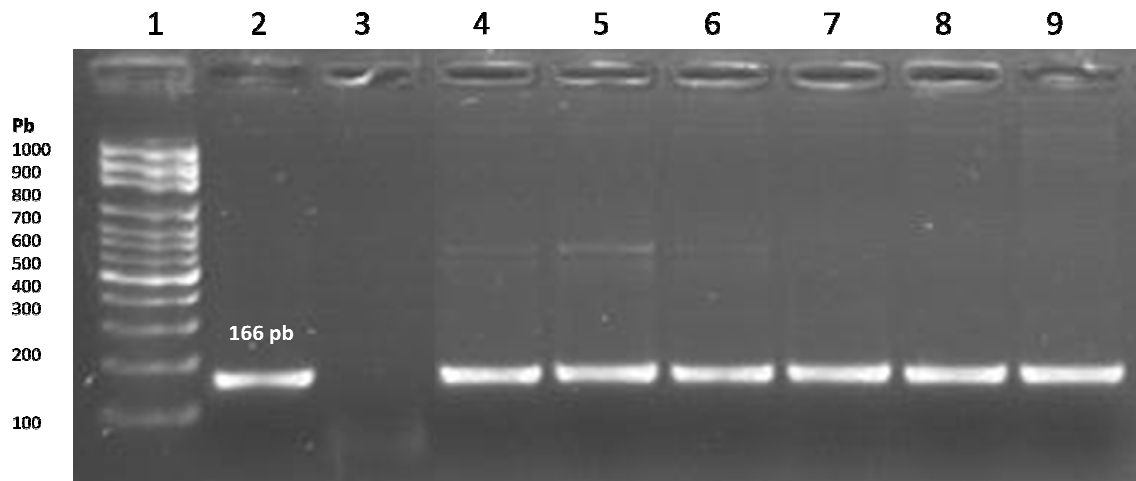


Figura 21. Electroferograma para visualizar los productos de PCR de la región mitocondrial constitutiva, control interno. **Pozo 1:** Marcador de peso molecular; **Pozo 2:** Control positivo (línea celular Caski); **Pozo 3:** Control negativo de la prueba; **Pozos 4 al 9:** Muestras positivas a la región mitocondrial constitutiva.

Con esto se comprueba la calidad del DNA y se asegura la fiabilidad de los resultados, ya que todas las muestras que conforman el Banco de Tejidos amplifican para la región mitocondrial, como se observa en el ejemplo de la Figura 21.

Después, a las muestras negativas para VPH 16, se les realizó una segunda PCR para detectar la presencia general de VPH, empleando primers universales que amplifican la región L1 del virus. Figura 22

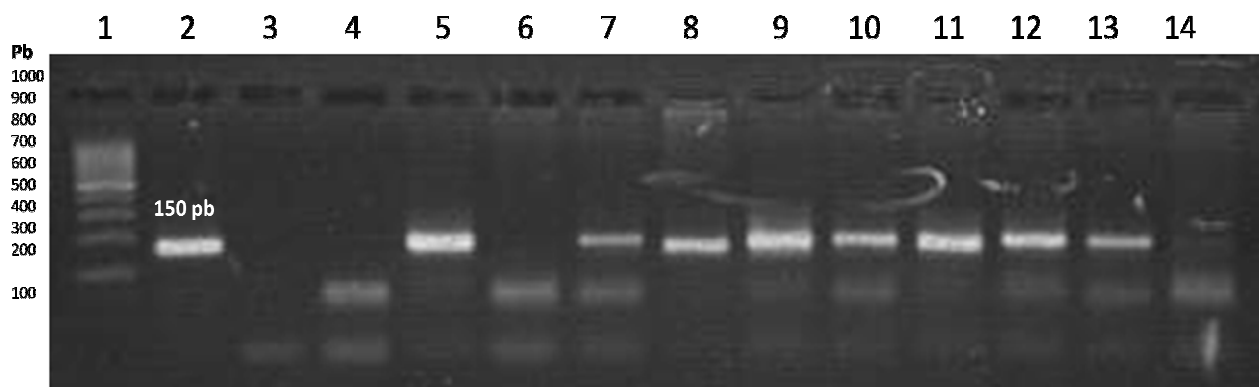


Figura 22. Electroferograma para visualizar los productos de PCR para la presencia de VPH general. **Pozo 1:** Marcador de peso molecular; **Pozo 2:** Control positivo a VPH (línea celular Hela); **Pozos 3 y 4:** Control negativo; **Pozos 5, 7 al 13:** Muestras positivas a la presencia de VPH; **Pozos 6 y 14:** Muestras negativas a la presencia de VPH.

Una vez que se identificó qué muestras se consideraban con infección por VPH, estas se analizaron con el Kit INNO-LIPA HPV Genotyping Extra, para determinar qué tipo o tipos virales se encontraban presentes en las muestras. La Figura 23 se muestra un ejemplo de las tiras con los resultados de la identificación por INNO-LIPA a una serie de muestras.

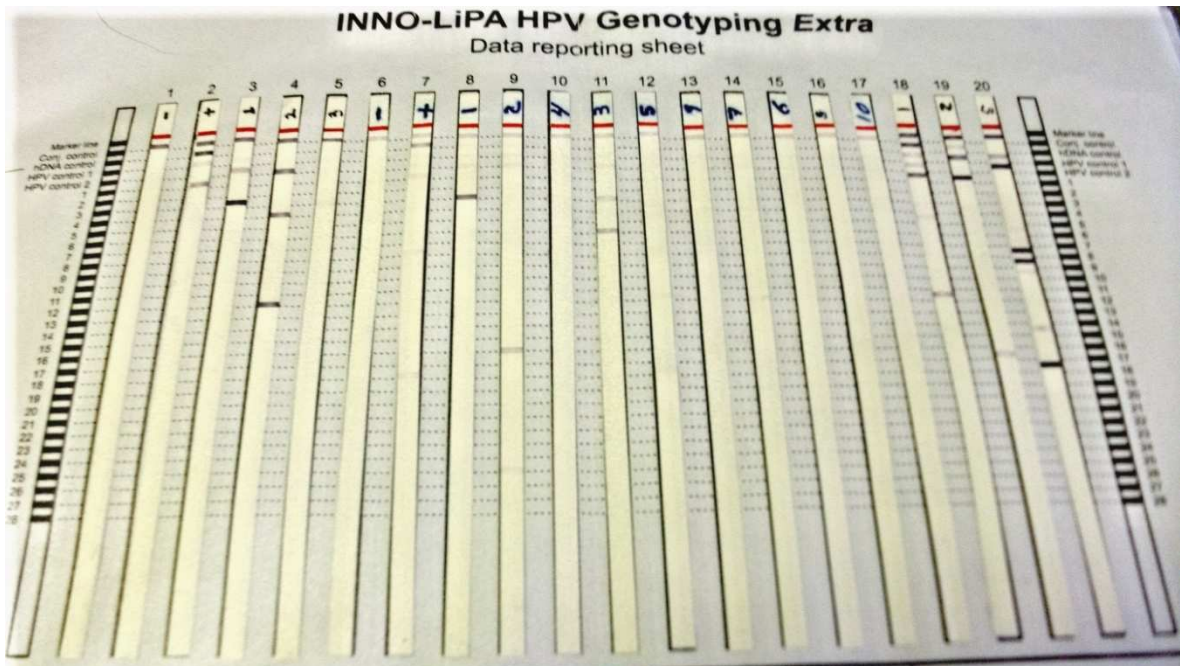


Figura 23: Tiras donde se da la Hibridación. **Tira 1, 6:** Controles negativos; **Tiras 2, 7:** Controles positivos; **Tiras 3, 4, 5, 8 - 20:** Muestras que fueron sometidas al Kit INNO-LiPA HPV (los resultados para las pruebas fueron muy variados).

Las muestras que dieron VPH negativo fueron consideradas como que no tenían infección por Virus de Papiloma Humano, por tal motivo, no se les realizó ninguna otra prueba; a las muestras que dieron VPH 16 positivo ya no se les realizó ninguna otra prueba ya que es el tipo viral más frecuente y el de mayor asociación con lesiones cervicales que desarrollan cáncer cervicouterino.

5.4 FRECUENCIA DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO.

En el 59.1% de las muestras totales del Banco de Tejidos hubo infección por el Virus de Papiloma Humano. Tabla 4.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
No	54	40.9	40.9	40.9
Si	78	59.1	59.1	100.0
Total	132	100.0	100.0	

Tabla 4. Cantidad total de muestras analizadas en el Banco de Tejidos con algún tipo de infección con VPH.

Dentro de este porcentaje el 75.6% son infecciones por VPH de alto grado y el 24.4% de coinfecciones, la mayoría de las coinfecciones envuelven tipos de alto grado. La Tabla 5 nos muestra los tipos de coinfecciones presentes en los distintos grupos del Banco de Tejidos.

Coinfección	CaCu	LEIAG	LEIBG	Sin Lesión
16, 31, 45	1	0	0	0
16,18,31	2	0	0	1
16,39,51, 52	0	0	1	0
18,31,58	1	0	0	0
31,26, 69/71	1	0	0	0
35,45,33	1	0	0	0
31,44	1	0	0	0
6,51	0	1	0	0

Tabla 5. Tipos de Coinfecciones presentes en el Banco de Tejidos.

No encontramos ningún tipo de coinfección que predominara, tan solo la coinfección de VPH 16, 18 y 31 se repitió 2 veces dentro de muestras con CaCu, más sin embargo no fue significativo.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, encontramos 11 tipos virales de alto grado (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58 y 26), 4 de bajo riesgo (6, 44, 73) y 1 de indeterminado (69/71). En las muestras Sin Lesión el 62.5% presentó infección por VPH de alto grado, mientras que las LEIBG el 85.7%

presento infección por alto grado, el 82.6% para LEIAG y el 69.7% para CaCu. La Tabla 6 nos indica la frecuencia con respecto al diagnóstico y el tipo de infección presentes. Grafico 11. ³²

Frecuencias			
Diagnostico	Alto grado	Coinfección	Total
Sin Lesión	5	1	6
CaCu	23	7	30
LIEAG	19	2	21
LIEBG	12	1	13

Tabla 6. Muestras del Banco de Tejidos con algún tipo de infección por VPH.

No se consideraron en alto, ni en coinfecciones a las muestras que dieron positivo a GP's pero que no se logró identificar el tipo viral que tenían.

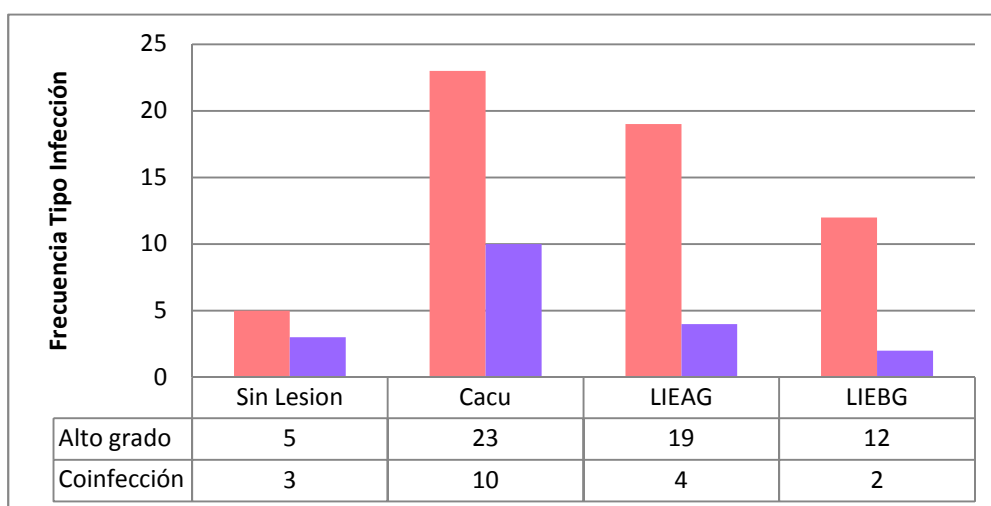


Grafico 11. Frecuencias del tipo de infección de acuerdo al grado de lesión.

Con respecto a los tipos virales presentes dentro del Banco de Tejidos, encontramos que el VPH 16 fue el más frecuente en todos los grupos que conforman el Banco, principalmente en el grupo de Cáncer Cérvicouterino se presenta con un 38%, seguido del grupo LEIAG con un 67%, en un 76% para LEIBG y finalmente en un 50% para las muestras clasificadas como Sin Lesión, estos resultados son individuales por grupo. La variación de diferentes tipos de VPH se observa en aumento con relación al grado de lesión, en este caso aumenta conforme aumentó la neoplasia. Grafica 12.

El segundo tipo viral más frecuente fue VPH 31 con un 9.5%, el tercero fue VPH 18 con un 6% seguido de VPH 45 con un 6% en general dentro del Banco de Tejidos.

Dentro del grupo clasificado como CaCu encontramos que el tipo viral más frecuente es VPH 16 con un 38%, en segundo lugar tenemos a VPH 31 con 14%, seguido del tipo VPH 45 con un 9%, en cuarto lugar encontramos a VPH 18 con un 8%, siendo estos los principales a considerar. Para el grupo con LEIAG se repite el patrón con VPH 16 como el principal con un 67%, en igual proporción encontramos a VPH 18 y 31 con un 4% pero aquí se hace más evidente la presencia de otros tipos virales no identificados con un 13%. En el grupo LEIBG el principal tipo viral fue de nueva cuenta VPH 16 con un 76% de ahí en fuera los otros tipos virales se encontraron en proporciones similares. Finalmente en el grupo clasificado como Sin Lesión VPH 16 predominó con un 50%, en un 20% volvemos a encontrar otros tipos de VPH no identificados como más frecuentes.

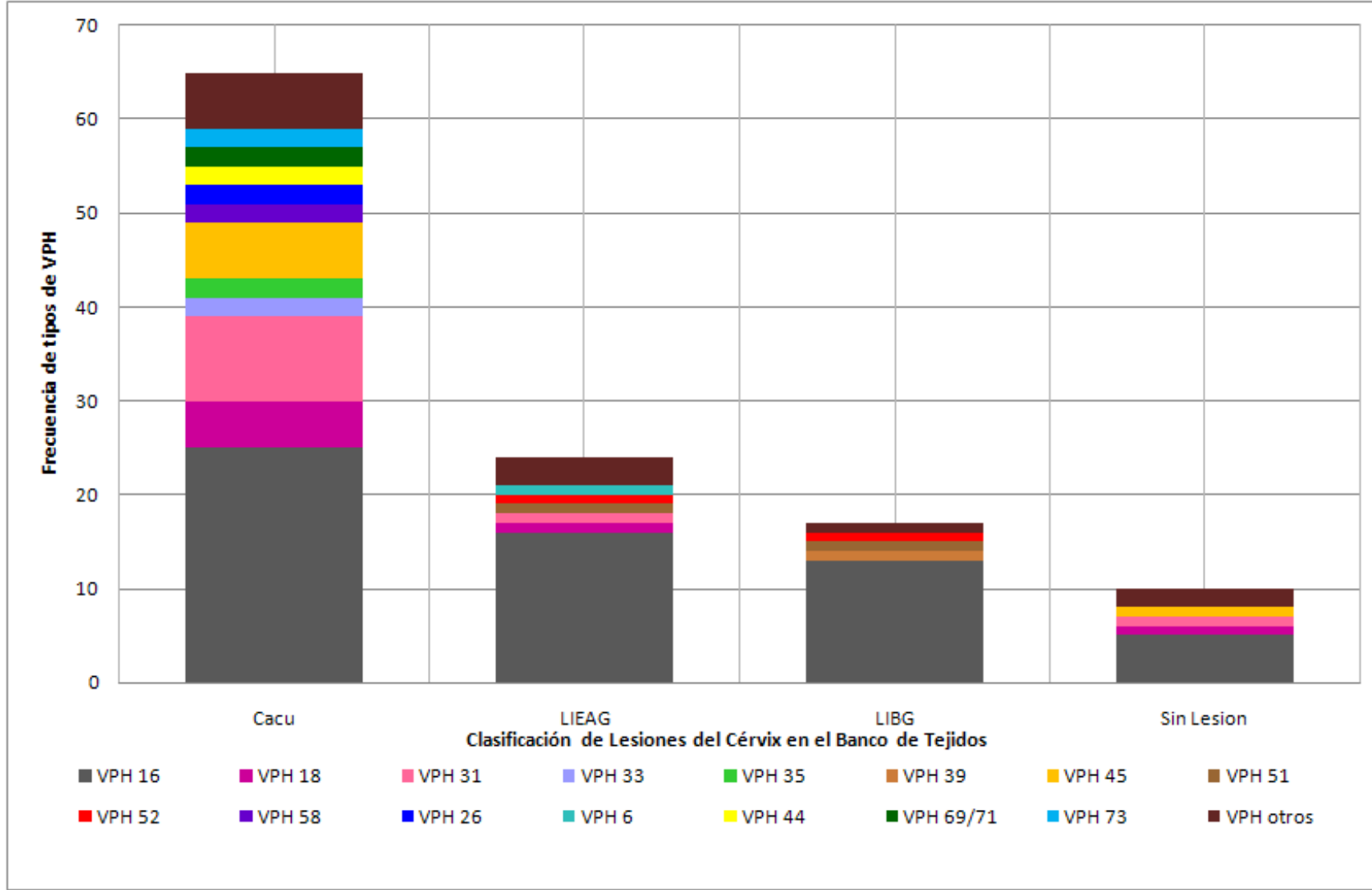


Grafico 12. Frecuencia de tipos VPH en los diferentes grupos Lesiones Cervical que conforman el Banco de Tejidos.

5.5 ANÁLISIS DESCRIPTIVO.

Para facilitar la lectura se presenta conjuntamente las variables estudiadas de la población con la asociación entre los diferentes grupos que conforma el Banco de Tejidos de acuerdo al diagnóstico.

Atendiendo a la clasificación de la población estudiada dentro del Banco de Tejidos, se hizo un análisis estadístico mediante Chi cuadrada comparando los múltiples factores de riesgo de este tipo de neoplasia vs el tipo de diagnóstico, con una $p \leq 0.05$ para ser considerado estadísticamente significativo.

5.5.1 Edad vs Diagnóstico

La edad se dividió en 2 grupos (≤ 40 años y > 40 años) y se comparó la frecuencia de la edad contra el diagnóstico, con lo cual encontramos diferencia estadísticamente significancia ($p= 0.00$). Tabla 7 y Grafico 13. A mayor edad aumenta el riesgo o susceptibilidad a desarrollar una lesión como se observa para CaCu y LIEAG, por otro lado a menor edad la lesión es leve o no existe, concordando con el hecho de que el cáncer se presenta con mayor frecuencia en mujeres mayores a los 35 años.

		Edad vs Diagnostico		Total
		≤ 40	> 40	
Diagnostico	Sin Lesión	12	11	23
	CaCu	11	45	56
	LIEAG	6	26	32
	LIEBG	18	2	20
Total		47	84	131

Tabla 7. Tabla de contingencia Edad vs Diagnóstico, $p=0.00$

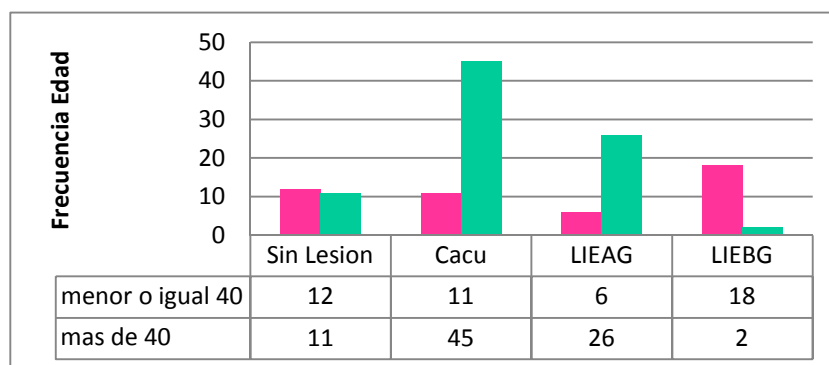


Grafico13. Comparación estadístico de la Edad vs el Diagnóstico.

5.5.2 Escolaridad vs Diagnóstico.

Para la Escolaridad encontramos que el valor $p= 0.12$ con lo cual observamos que no fue estadísticamente significativa la relación entre la Escolaridad y el Diagnóstico. Tabla 8 y Grafico 14.

		Escolaridad vs Diagnóstico					Total
		No estudio	Primaria	Secundaria	Preparatoria	Universidad	
Diagnóstico	Sin Lesión	5	9	5	3	1	23
	CaCu	10	32	10	2	0	54
	LIEAG	8	11	6	6	1	32
	LIEBG	1	9	3	5	2	20
Total		24	61	24	16	4	129

Tabla 8. Tabla de contingencia entre el nivel de Escolaridad vs Diagnóstico. $p=0.12$

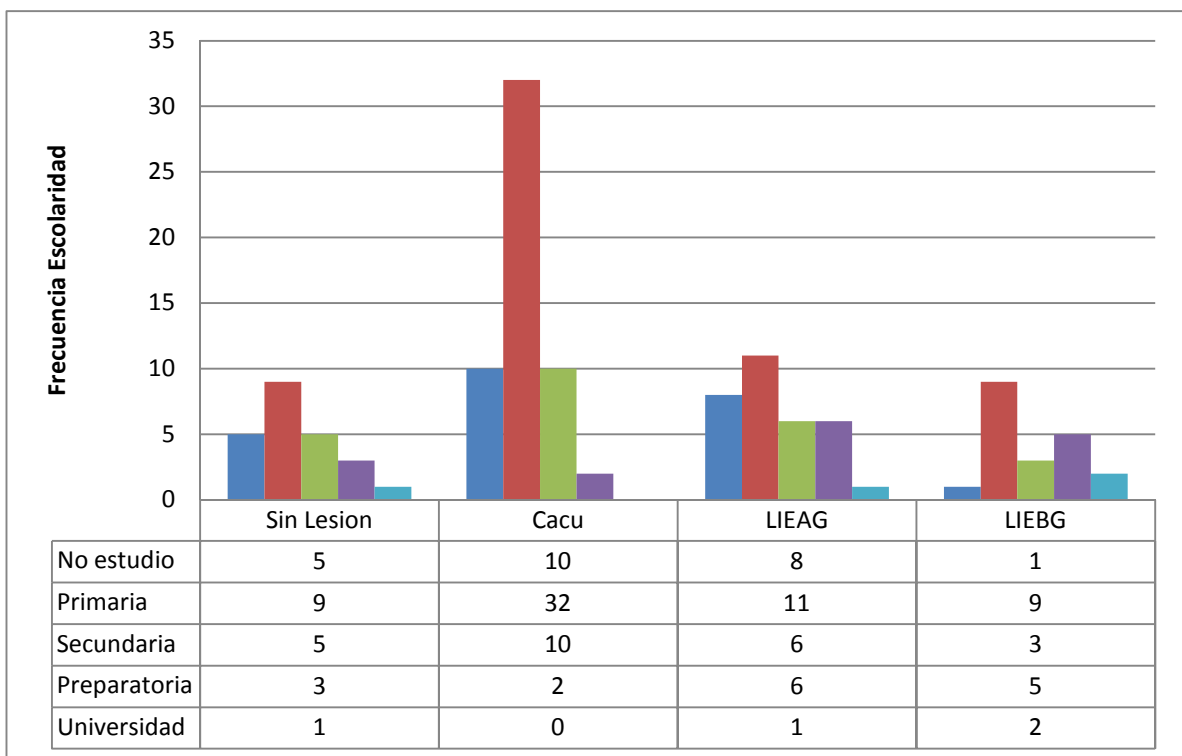


Grafico 14. Representación grafica del análisis comparativo del nivel de Escolaridad vs Diagnóstico.

5.5.3 Número de embarazos vs Diagnóstico.

El número de Embarazos se agrupó en dos conjuntos (≤ 2 embarazos y > 2 embarazos) con lo cual encontramos que efectivamente existe una relación entre el número de embarazos y el diagnóstico, con un valor $p= 0.00$. Tabla 9 y Grafico 15. A mayor número de embarazos aumenta la susceptibilidad a desarrollar una LIEAG o CaCu aunque en las lesiones de bajo grado el número de embarazos es similar, existe una clara relación del número de embarazos y el desarrollo de CaCu.

		Embarazos vs Diagnóstico		Total
		≤ 2	> 2	
Diagnóstico	Sin Lesión	4	16	20
	CaCu	8	47	55
	LIEAG	6	26	32
	LIEBG	11	8	19
	Total	29	97	126

Tabla 9. Tabla de contingencia para el análisis del número de Embarazos y el Diagnóstico.

$p=0.00$

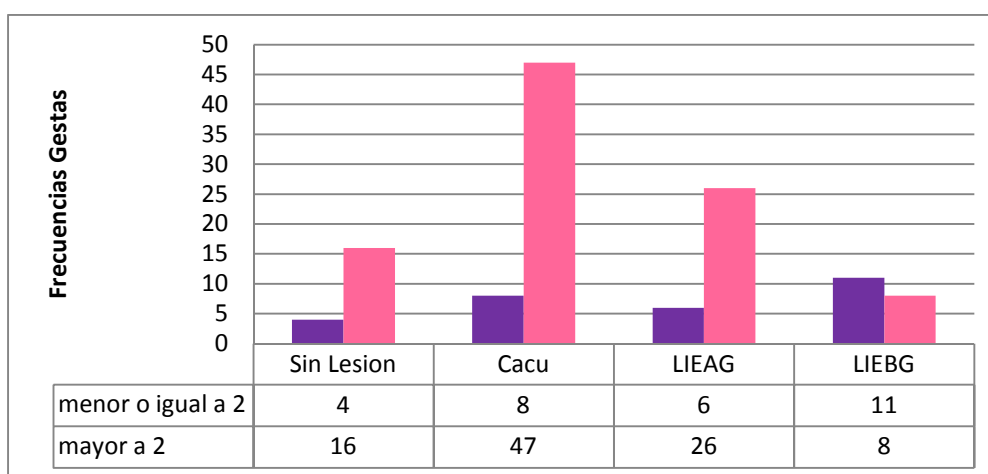


Grafico 15. Representación grafica del análisis comparativo entre el número de Embarazos y el Diagnóstico.

En lo que respecta al número de partos vs el diagnóstico el comportamiento de los resultados analizados fue el mismo que para el número de embarazos, por tal motivo se decidió omitir los resultados.

5.5.4 Menarca vs Diagnóstico.

Para la comparación entre el Diagnóstico y la edad de la Menarca encontramos un valor de $p=0.04$ con lo cual decimos que existe significancia estadística entre la edad de la menarca y el diagnóstico en las pacientes que conforman el Banco de Tejidos; ver Tabla 10 y Grafico 16.

		Diagnostico vs Menarca		Total
		≤ 12	> 12	
Diagnostico	Sin Lesión	11	12	23
	CaCu	12	43	55
	LIEAG	11	21	32
	LIEBG	10	10	20
Total		44	86	130

Tabla 10. Tabla de contingencia del análisis comparativo entre el Diagnóstico y la edad de inicio de la Menarca en la población estudiada. $p= 0.04$

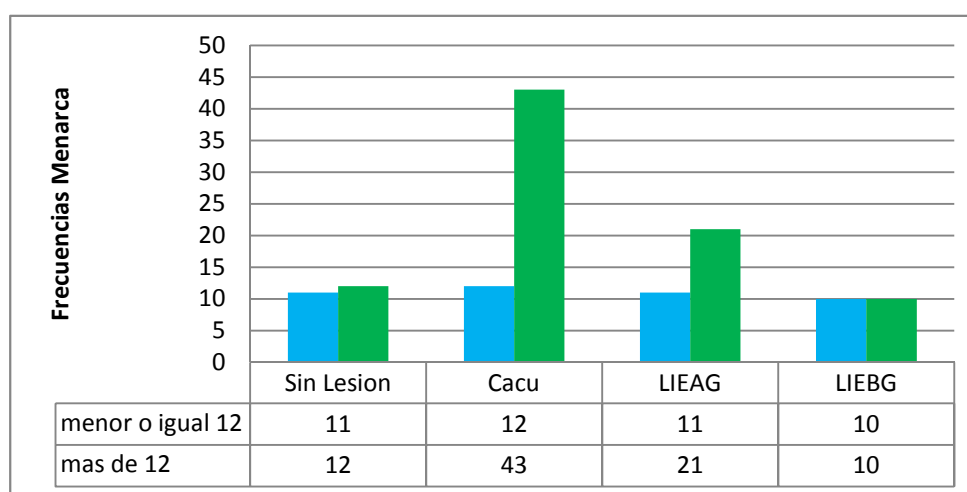


Grafico 16. Representación grafica del analisis comparativo entre el Diagnóstico y la edad de inicio de la Menarca.

5.5.5 Menopausia vs Diagnóstico.

Mientras tanto los resultados obtenidos del análisis comparativo resultante de la Edad de Menopausia nos dicen que no existe significancia estadística entre la Menopausia y el Diagnóstico $p= 0.24$; ver Tabla 11 y Grafico 17.

		Diagnostico vs Menopausia		Total
		≤ 40	> 40	
Diagnostico	Sin Lesión	4	4	8
	CaCu	6	22	28
	LIEAG	4	14	18
Total		14	40	54

Tabla 11. Tabla de contingencia del análisis comparativo Chi cuadrada entre la edad de Menopausia y Diagnóstico. En este caso las muestras diagnosticadas con LEIBG, ninguna de las pacientes se encontraba en Menopausia, por consiguiente solo se observan 3 grupos. $p=0.24$

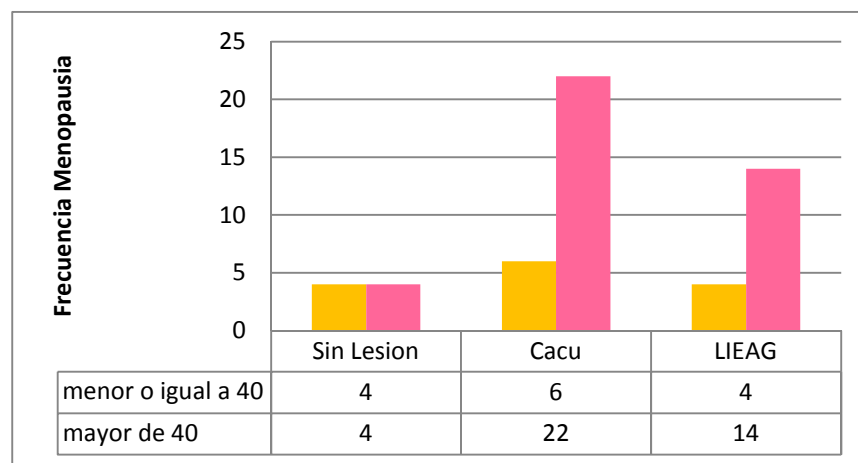


Grafico 17. Representación grafica del análisis comparativo de Diagnóstico vs Menopausia.

5.5.6 Inicio de vida sexual activa (IVSA) vs Diagnóstico.

En lo que respecta al Inicio de Vida Sexual Activa (IVSA) el valor fue $p=0.30$ que apoya que no hay ninguna relación entre el Diagnóstico y la edad de Inicio de Vida Sexual Activa (IVSA), al no ser el valor estadísticamente significativo; Tabla 12, Grafico 18.

		Diagnostico vs IVSA		Total
		≤18 años	>18 años	
Diagnostico	Sin Lesión	15	7	22
	CaCu	33	22	55
	LIEAG	25	7	32
	LIEBG	15	5	20
Total		88	41	129

Tabla 12. Tabla de contingencia de la relación entre IVSA y Diagnóstico. $p=0.30$

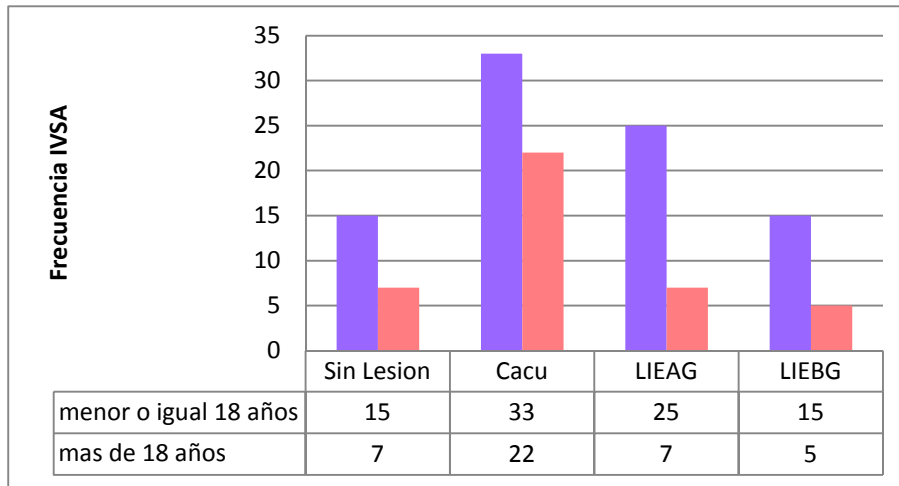


Grafico 18. Representación grafica del comparativo entre IVSA vs Diagnóstico.

5.5.7 Parejas sexuales vs Diagnóstico.

Al relacionar el número de Parejas Sexuales (PS) y el Diagnóstico (Tabla 13), no hubo presente ninguna evidencia estadísticamente significativa, y lo que nos permite descartar dicha asociación; Grafico 19.

		Diagnostico vs PS		Total
		≤ 2	> 2	
Diagnostico	Sin Lesión	19	3	22
	CaCu	44	10	54
	LIEAG	21	11	32
	LIEBG	13	7	20
Total		97	31	128

Tabla 13. Relación de número de PS vs Diagnóstico. $p=0.14$

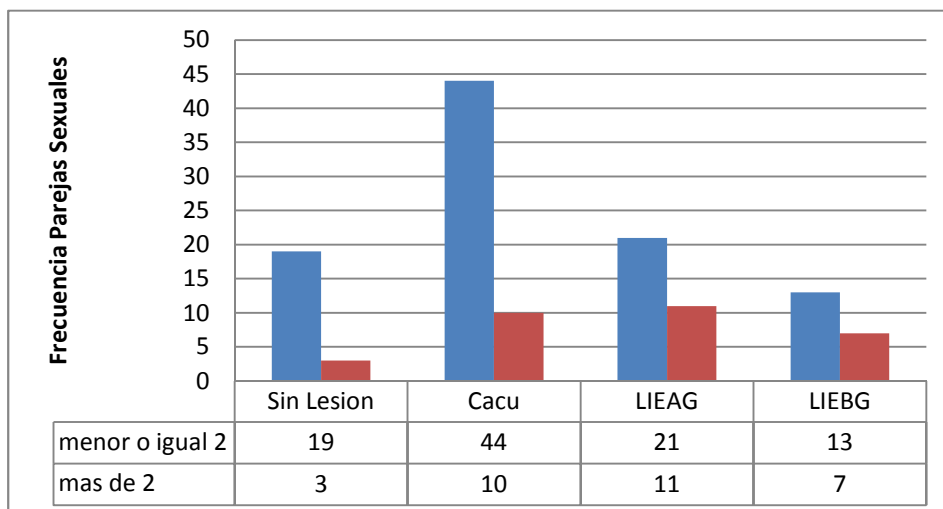


Grafico 19. Grafico representativo de la comparación entre PS vs Diagnóstico.

5.5.8 Uso de Anticonceptivos vs Diagnóstico.

Por uso de anticonceptivos, el resultado de $p=0.33$ no se ha encontrado diferencia significativa tanto en el uso, como en el no uso de anticonceptivos; Tabla 14 y Grafico 20.

		Diagnostico vs Anticonceptivos		Total
		No	Si	
Diagnostico	Sin Lesión	11	10	21
	CaCu	23	30	53
	LIEAG	18	14	32
	LIEBG	6	13	19
Total		58	67	125

Tabla 14. Análisis comparativo entre uso de Anticonceptivos y Diagnóstico, $p= 0.33$.

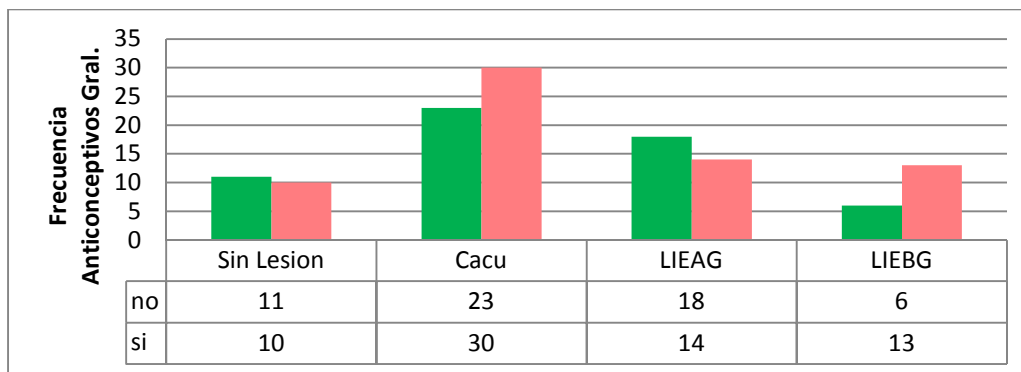


Grafico 20. Representación de la comparación entre el uso de Anticonceptivos y Diagnóstico.

5.5.9 Tabaquismo y Alcoholismo vs Diagnóstico.

Tabaquismo el valor $p= 0.19$, indicando que no es estadísticamente significativo, mientras que para Alcoholismo $p= 0.01$ indicando claramente que existe una significancia estadística en relación con tipo de diagnóstico; Gráficos 21 y 22.

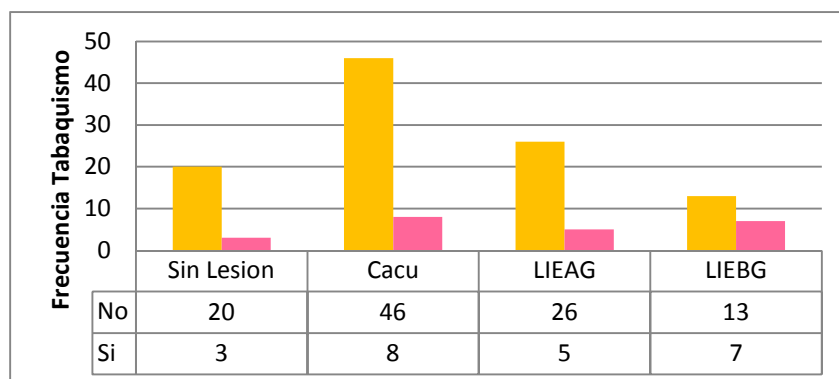


Grafico 21. Tabaquismo vs Diagnóstico

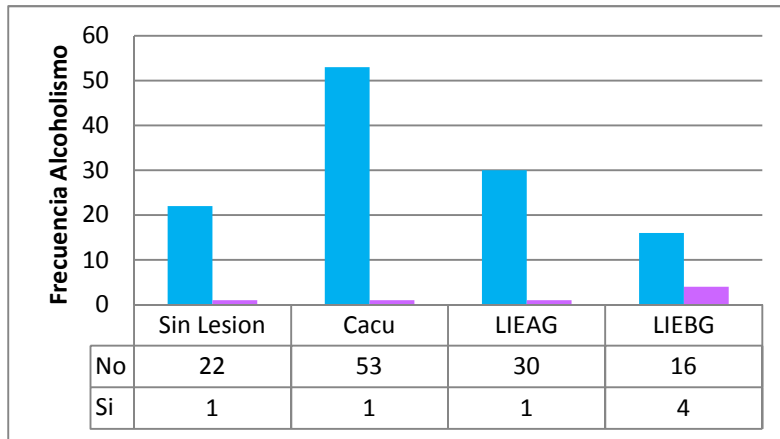


Grafico 22. Comparación entre Alcoholismo y Diagnóstico.

5.5.10 Antecedente de Familiar con cáncer vs Diagnóstico.

En lo que respecta si existe una relación entre la existencia de un Familiar con Cáncer y el Diagnóstico (Tabla 15) de la neoplasia se encontró que $p=0.07$, lo que nos indica que no existe una relación significativa entre esta variable y la neoplasia; Grafico 23.

		Familia con Cáncer		Total
		No	Si	
Diagnostico	Sin Lesión	18	4	22
	CaCu	36	17	53
	LIEAG	16	16	32
	LIEBG	15	5	20
Total		85	42	127

Tabla 15. Relación entre la existencia de un Familiar con Cáncer y la neoplasia desarrollada.

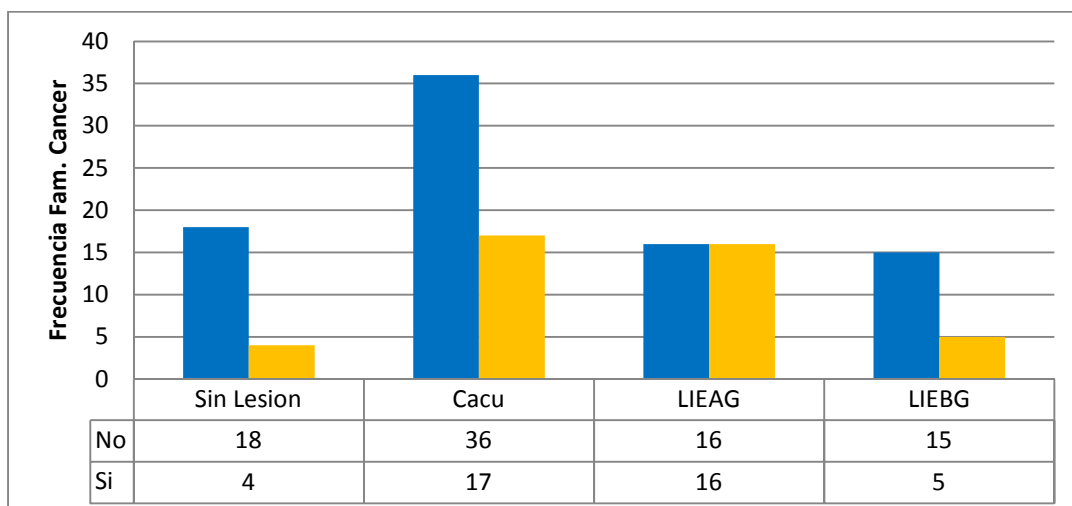


Grafico 23. Familiar con Cáncer vs Neoplasia

5.5.11 Infección con Virus de Papiloma Humano vs Diagnóstico

Cuando buscamos un concordancia estadística entre el desarrollo de la neoplasia con la presencia de VPH (Tabla 16), encontramos que el valor $p=0.03$ indicando que efectivamente hay una relación entre la presencia de VPH y la neoplasia, siendo estadísticamente significativo. Grafico 24.

		Infección VPH		Total
		No	Si	
Diagnostico	Sin Lesión	15	8	23
	CaCu	23	33	56
	LIEAG	10	23	33
	LIEBG	6	14	20
Total		54	78	132

Tabla 16. Comparación entre la presencia o ausencia de infección por VPH y la Neoplasia.

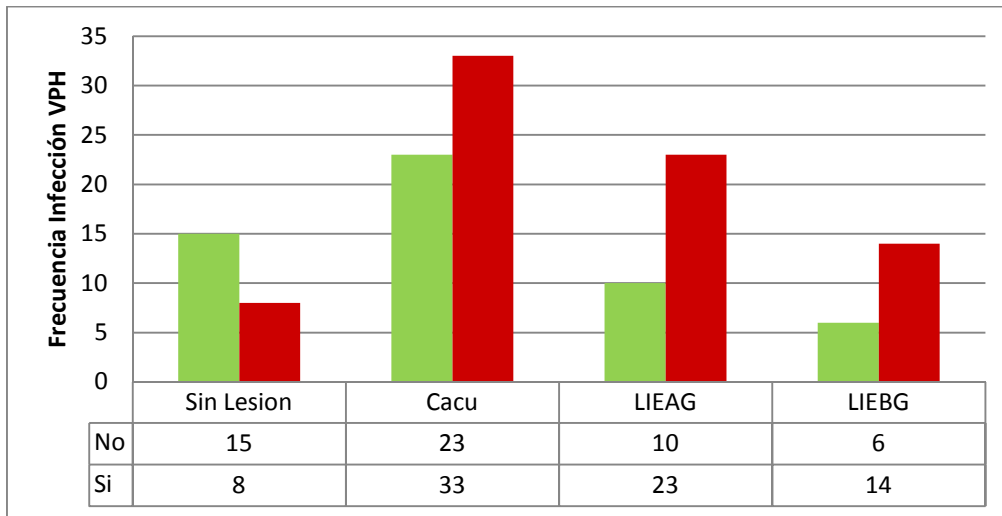


Grafico 24. Infección por VPH y el Diagnóstico, comparación.

5.5.12 Tipo de Infección por Virus de Papiloma Humano vs Diagnóstico

Por otro lado, se analizó si existía alguna relación entre el tipo de infección (Tabla 17), con lo que nos encontramos que $p = 0.09$, indicando que no hay evidencia estadísticamente significativa con respecto al tipo de infección y el diagnóstico. Grafico 25.

		Tipo infección VPH			Total
		Sin infección	Alto grado	Coinfección	
Diagnostico	Sin Lesión	15	5	3	23
	CaCu	23	23	10	56
	LIEAG	10	19	4	33
	LIEBG	6	12	2	20
Total		54	59	19	132

Tabla 17. Relación estadística entre el tipo de infección con el Diagnóstico.

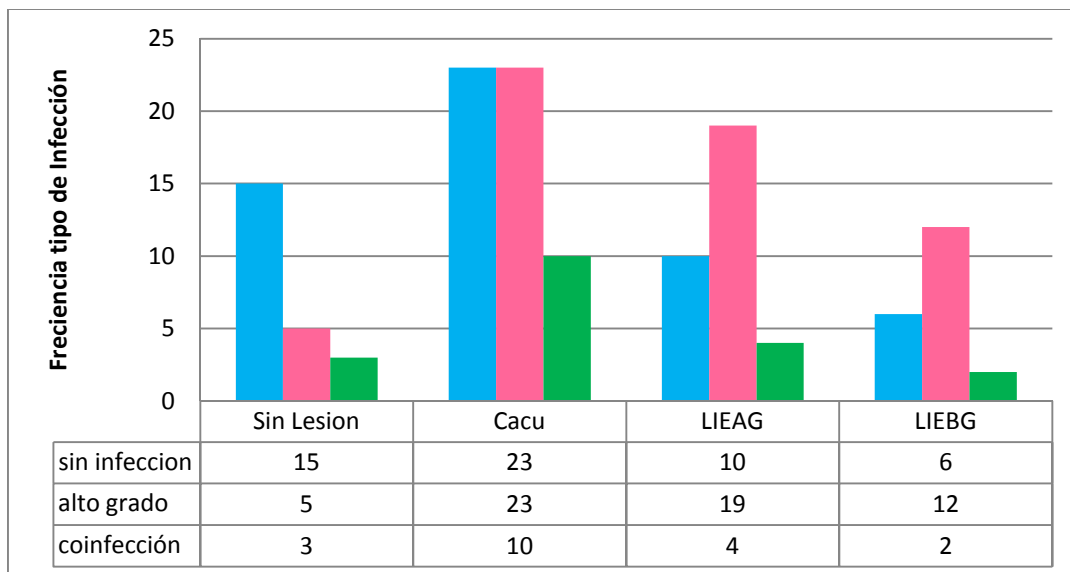


Grafico 25. Representación de la comparación entre el tipo de infección y el Diagnóstico.

6. Discusión

El aspecto más importante de este trabajo fue la conformación de un Banco de Tejidos de Lesiones cervicales y hay que señalar que en el país solo existe un Banco de Tejidos el cual pertenece al Instituto Nacional de Cancerología (INCan)². Por ello, se tiene que buscar formar más Bancos de Tejidos que ayuden en la investigación. Para cualquier institución que realice investigación básica y/o clínica esta herramienta es fundamental, nosotros lo comprobamos, con el esfuerzo de 2 años de estar buscando en una de las principales instituciones de salud en el país y a base de prueba y error se han logrado las bases para obtener lo mas importante en cualquier proyecto de investigación, las muestras, que sin lugar a dudas son el material más importante en la investigación y lo más difícil de adquirir, con la formación de este Banco de Tejidos hemos logrado un cantidad realmente valiosa a base de un esfuerzo multidisciplinario y que ha brindado la ayuda a múltiples proyectos cumpliendo con su objetivo.

Este Banco de Tejidos crea la posibilidad de nuevas fuentes para la investigación, creación de nuevos diagnósticos obtención de nuevos blancos terapéuticos con un gran impacto a nivel clínico, social, económico y quizás uno muy importante, el tiempo, ya que la investigación biomédica va contra reloj si se busca realmente resolver los principales problemas de salud mundial y esto no se logra sino se crean redes donde pueda haber intercambio de información y muestras que abarquen de forma representativa a la población afectada; este intercambio de información tanto terapéutica, epidemiológica y molecular no se logra si no existen grandes Bancos de Tejidos que brinde la información básica y que permita a las instituciones en investigación, obtener las muestras en las condiciones, tiempo y forma adecuada.

El factor de impacto de este Banco de Tejidos es en las publicaciones y en su estrecha integración en los ensayos clínicos que se han realizado en el Laboratorio de Oncología Genómica, que sin éste no habrían sido posible y no serian posibles los futuros proyectos. El Banco de Tejidos ha brindado ayuda,

respuestas y se han descubiertos datos de gran relevancia, ha dejado información que se ha estudiado y que aún falta por estudiar, en donde entraría este punto también importante que es el intercambio de información a nivel institucional e inter institucional.

Otro de los aspectos relevantes, que por la naturaleza del Banco de Tejidos cervicales, es el papel de la infección por el virus de papiloma humano, el aspecto epidemiológico. El virus del papiloma humano se encuentra reportado como el principal factor etiológico en el desarrollo de lesiones cervicales y Cáncer Cérvicouterino, aunado a esto, existen millones de mujeres que se han infectado por este virus en algún período de su vida, por tal, el tema de detectar la infección en una etapa oportuna se vuelve muy importante para cualquier sistema de salud en cualquier país, principalmente en el nuestro en donde el Cáncer Cérvicouterino representa el segundo lugar en mortalidad para mujeres en México.

Hay evidencia molecular que indica que el tipo viral 16 es el principal causante de cáncer de cérvix y en segundo se encuentra reportado el 18, por tal existe una fuerte asociación entre tipos virales de alto poder oncogénico y el desarrollo de cáncer así como de lesiones cervicales²⁷.

Respecto a nuestros datos, encontramos similitud con lo reportado en la literatura en cuanto al hecho de que el virus de papiloma humano tipo 16 si se presenta como el principal genotipo en las muestras de pacientes que conforman el Banco de Tejidos, este fue el principal en todos los grupos de lesiones cervicales; en donde encontramos discrepancias con lo reportado en la literatura fue, el hecho de que el tipo viral 18 que se considera como el segundo más importante a nivel mundial, para nosotros fue el tercero a nivel global y si nos enfocamos únicamente al grupo de muestras con Cáncer cervicouterino el tipo 18 fue el cuarto más frecuente. Con esto revelamos información realmente importante ya que la frecuencia de tipos virales en nuestro país se comporta de una manera muy diferente a lo reportado, esto es consistente con otros trabajos realizados en nuestro grupo donde la prevalencia es similar³³.

Con estos resultados podemos inferir, más que una simple diferencia en cuestión a prevalencias, esto es, se involucra otros aspectos y uno muy importante del cual vale la pena hablar es acerca de la vacuna contra el virus de papiloma humano, la cual contiene partes de los tipos 6, 11, 16 y 18. Nuestros datos sugieren que este producto vacunal en nuestra población no es efectivo al 100% por no incluir los tipos virales que verdaderamente prevalecen en la población. Vale la pena recalcar estos resultados, ya que realmente no funcionaría, porque solo cubriría un solo tipo viral (VPH 16) e ignoraría los otros que están presentes en un alto porcentaje, destacando que estos otros tipos virales son también de alto riesgo. Por tal, el objetivo de la vacuna no se ve cumplido o dejaría de lado a un porcentaje bastante considerable a riesgo por una infección, a su vez tendría repercusiones a nivel social, cultural y económico en la paciente y a nivel de salud pública habría un impacto a nivel clínico e inclusive económico.

Aunando en la información general presente en la población, la edad que nuestra población presenta se encuentra dentro del rango según lo reportado (35 a 55 años)¹⁰, muy similar a lo reportado anteriormente en nuestro grupo de trabajo; la edad sugiere que las mujeres mayores a 40 años son consideradas vulnerables al desarrollo de una lesión, en especial a desarrollo de CaCu y un alto número de embarazos y partos también se ve implicado en el desarrollo de lesiones cervicales. Esto indica, más infecciones por virus de papiloma humano a una edad muy temprana, si bien estos resultados se ven afectados de sobremanera en que la mayoría de las pacientes contaban con un nivel de escolaridad básico y bien sabemos que el nivel cultural influye en el estado de salud así como la importancia que tienen la ocupación, la clase social y estilo de vida que son variables que explican la asociación entre la educación y la salud. La mayoría inició su vida sexual a temprana edad, hubo un alto número de embarazos, partos, consumo de alcohol y el uso de anticonceptivos coincidió con lo reportado en la literatura^{34, 21}.

Aun cuando la población estudiada se comporto al menos en parte similar a lo reportado en la literatura, también encontramos algunas diferencia, ya que el consumo de tabaquismo no fue el esperado como factores de riesgo asociados al cáncer de cérvix (referencia 21), y algo también interesante y rescatable fue el número de parejas sexuales, la mayoría de la pacientes solo tuvieron una pareja sexual, esto nos refleja un problema a nivel socio-cultural, al ser la infección de VPH de tipo sexual y si la paciente solo tuvo una pareja sexual esto deja ver que la pareja es quien fungió como vector.

Finalmente, este Banco de Tejidos nos proporcionará datos de una población mexicana estudiada la cual compartirá características generales más no clínico patológicas. Cumpliendo con los estándares éticos y legales, respetando el enorme valor de cada muestra que se integre en el.

7. Conclusiones

Se logró hacer la conformación y logística para un Banco de Tejidos de Lesiones cervicales en mujeres mexicanas; un Banco de Tejidos dinámico para su uso inmediato y mediato.

Se han sentado las bases para fortalecer y robustecer el Banco de Tejidos de Lesiones cervicales en mujeres mexicanas.

Se logró tener una mayor caracterización del Banco de Tejidos, llevando a cabo las tipificaciones de los distintos VPH.

8. Perspectivas

Este proyecto es muy grande y lo que se realizó con el presente trabajo, solo fue sentar las bases, crear una logística y demostrar la importancia que este tiene en el futuro de la investigación de nuestro país. Mas sin embargo debe continuar, seguir con la colecta de muestras, ampliar el tipo de muestras colectadas y el tipo de población muestreada.

Incorporar la colecta de fluidos (suero, plasma, saliva y orina), para enriquecer el Banco y la información que este puede proporcionar a la institución e investigación.

Este proyecto puede servir como ejemplo para que otras instituciones de salud que hacen investigación incorporen un Banco de Tejidos con el fin de acrecentar la información científica, y pueda crearse redes de información a nivel nacional e internacional y se puedan impulsar nuevos aspectos de investigación en el campo de la salud en México.

9. Anexo 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO IDENTIFICADO

Lugar y Fecha México DF a _____ de _____

Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado: _____

Una huella genética para determinar la susceptibilidad al desarrollo del cáncer cervicouterino

Registrado ante la CNIC con el número: _____

FIS – 7114 - IMSS

El objetivo del estudio es:

Identificar y caracterizar el grupo de genes que se asocian con el cáncer cervicouterino

Se me ha explicado que mi participación consistirá en: La obtención de un fragmento de mi tejido del cérvix

durante la realización de la histerectomía, la cual no será diferente de lo habitual, en la fecha _____, cuyo tejido sea utilizado para realizar estudios de investigación importantes para saber más acerca de este tipo de lesiones.

Declaro que se me ha informado que por mi participación en el estudio no voy a presentar ningún riesgo, molestias ni beneficios adicionales.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme o retirar mi muestra biológica del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto. Entiendo que una parte de la muestra biológica será utilizada para identificar la presencia o ausencia del Virus del Papiloma Humana, así como estudios de investigación siguiendo los lineamientos aquí estipulados. Esta muestra además será almacenada a 4°C durante un periodo de 8 años a partir de la toma de la muestra y pasado este tiempo será desechada.

El Investigador Responsable me ha dado seguridad de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Nombre y firma del paciente

Mauricio Salcedo, Número de matrícula 10231803

Números telefónicos a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio:

56276900 Extensión 22706

Testigos

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA
DE PACIENTES CON CÉRVIX NORMAL**

Lugar y Fecha México DF a _____ de _____

Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado: _____

Una huella genética para determinar la susceptibilidad al desarrollo del cáncer cervicouterino

Registrado ante la CNIC con el número: _____

FIS – 7114 – IMSS

El objetivo del estudio es:

Identificar y caracterizar el grupo de genes que se asocian con el cáncer cervicouterino

Se me ha explicado que mi participación consistirá en: La obtención de un fragmento de mi tejido del cérvix

durante la realización de la histerectomía, la cual no será diferente de lo habitual, en la fecha _____, cuyo tejido sea utilizado para realizar estudios de investigación importantes para saber más acerca de este tipo de lesiones.

Declaro que se me ha informado que por mi participación en el estudio no voy a presentar ningún riesgo, molestias ni beneficios adicionales.

El Investigador Responsable me ha informado que el hecho de que se utilice un fragmento de mi cérvix no implica que tenga una malignidad en el mismo.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme o retirar mi muestra biológica del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto. Entiendo que una parte de la muestra biológica será utilizada para realizar identificar la presencia o ausencia del Virus del Papiloma Humana, así como estudio de investigación siguiendo los lineamientos aquí estipulados. Esta muestra además será almacenada a 4°C durante un periodo de 8 años a partir de la toma de la muestra y pasado este tiempo será desechada.

El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Nombre y firma del paciente

Mauricio Salcedo, Número de matrícula 10231803

Números telefónicos a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio:

56276900 Extensión 22706

Testigos

HISTORIA CLÍNICA

NO/CLAVE DE MUESTRA: _____ No. Expediente (afiliación) _____

Nombre: _____ Edad: _____ años Teléfono: _____

Lugar de nacimiento _____

Lugar donde vive actualmente _____

Escolaridad máxima:

___ no estudio ___ primaria ___ secundaria ___ bachillerato ___ licenciatura

Gestas: _____ No. de partos _____ Cesáreas _____ Abortos _____

Edad de la menarca _____ años Edad de la menopausia _____ años

Inicio de la vida sexual _____ años No. parejas sexuales _____

Métodos anticonceptivos:

___ tabletas ___ inyectables ___ dispositivo _____ otros (esp.) Uso

___ meses/años

Tabaquismo ___ no ___ si _____ frec. Alcoholismo ___ no ___ si _____ frec

Ant. familiares ___ no ___ si Parentesco _____ tipo de cáncer

_____ desconocido _____

Edad del 1er PAP _____ años _____ Frecuencia

Tiempo del último PAP _____ días _____ meses _____ años

FEUM (Fecha de la Última Menstruación) _____

Resultado del Pap:

_____ normal _____ infección bact/hong. _____ HPV _____ cáncer

_____ otra causa (especificar) _____ no sabe

Diagnóstico clínico: _____

Etapa clínica: _____

Tratamiento indicado: _____

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Canadian Institutes of Health Research. www.cihr-irsc.gc.ca
2. Ruíz G., et al, Organization of a tumor bank: The Experience of the National Cancer Institute of México, Pathobiology, 2010; 77: 147-154.
3. Hirtzlin I., et al, An empirical Survey on Biobanking of Human Genetic material and data in six EU countries, European Journal of Human Genetics, 2003; 11: 475-488.
4. Morales P., et al, The Importance of Ethic in the Field of Human Tissue Banking, Cell and Tissue Banking, December 15, 2010, 1-15.
5. Morente M., et al, Current Challenges of Human Tumour Baking, Hematological Oncology, 2005; 23: 54-56.
6. Qualman SJ., et al, Establishing a Tumour Bank: Banking, Informatics an Ethics, British Lournal of Cancer, 2004; 90: 1115-1119.
7. Bell W., et al, How to Efficiently Obtain Human Tissues to Support Specific Biomedical Research Projects, Cancer Epidemiology& Biomarkers Prevention, 2009; 18:1676-1679.
8. Harvard Cancer Center Office for the Protection of Research Subjects Dana-Farber Cancer Institute. http://www.dana-farber.org/tissue_banking
9. Jenkins D., Histopathology and Cytopathology of Cervical Cancer, Diseases Markers, 2007; 23: 199-212.
10. Schiffman M., et al, Human Papillomavirus and Cervical Cancer, Lancet, 2007; 370: 890–907.
11. Hilario E., Morfología del Cérvix Uterino, Departamento de Biología Celular e Histología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. España.
12. Cabrera A., Relación entre la presencia de lesión cervical y variables epidemiológicas seleccionadas, Ginecología y obstetricia. Enfermedades Infecciosas I, 2007.
13. Organización Mundial de la Salud (OMS).
<http://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=3&chap=2>

14. Kay JK., et al, Current Concepts in Cervical Pathology, Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2009; 133: 729-738.
15. Patología del Cuello Uterino.
http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/tercero/anatomiaopatologica/imagenes_ap/patologia1028-1036.html
16. Ciaran BJ, et al, The Natural History of cervical HPV infection: unresolved issues. Natures Reviews Cancer, 2007; 7: 11-22.
17. Cáncer cervical. http://e-ciencia.com/recursos/enciclopedia/Cáncer_cervical
18. Ahmedin J., et al, Global Cancer Statistics, CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2011; 000: 000-000.
19. Gutiérrez X., et al, Molecular Diagnosis of Human Papillomavirus in the Development of Cervical Cancer, Salud Pública de México, 2009; 51: S479-S488.
20. López S., et al, Cáncer Cérvicouterino y El Virus del Papiloma Humano: La Historia que no termina, Cancerología, 2006; 1: 31-53.
21. Castellsagué X., et al, Enviromental co-factor in HPV carcinogenesis, Virus Research, 2002; 89:191-199.
22. Harald H., Papillomaviruses and Cancer: From basic studies to clinical application, Nature, 2002; 2: 342-350.
23. Cruz L., et al, Mecanismos moleculares de los cofactores asociados con el cáncer de cuello uterino, Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología, 2004; 30, 0-3.
24. Hernández T., Alteraciones metabólicas en el alcoholismo, Revista Cubana Alimentación y Nutrición, 1996; 10: 1.
25. López S., et al, Cáncer Cérvicouterino y el Virus del Papiloma Humano: La Historia que no termina, Cancerología, 2006; 1: 31-55.
26. Stanley MA., et al, HPV: from infection to cancer, Biochemical Society Transactions, 2007; 35: 6.
27. Muñoz N., et al, Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer, The New England Journal of Medicine, 2003; 348: 518-527.

28. Lonworth S., et al, Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia, Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2004; 68: 362-372.
29. Arends MJ., et al, Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia, Journal of Clinical Pathology, 1998; 51: 96-103.
30. Clifford MG., et al, Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis, Lancet, 2005; 366: 991–98
31. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Técnicas Histológicas. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/1-introduccion.php>
32. Muñoz O., et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus type s associated with cervical cancer. The New England Journal of Medicine. 2003; 348: 518-527.
33. Stanley M., Pathology and Epidemiology of HPV infection in females, Gynecologic Oncology, 2010; 117: S5-S10.
34. Piña P., et al, Human Papillomavirus-specific viral types are common in Mexican women affected by cervical lesions, International Journal of Gynecological Cancer, 2006; 16: 1041-1047.