



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

PREVALENCIA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN MUJERES
INFECTADAS CON EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE
**LICENCIADA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA**

PRESENTA
FABIOLA MARTINEZ QUEZADA

Director de tesis: Dr. Alejandro García Carrancá

Facultad de Medicina



México DF

Abril 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se desarrolló bajo la dirección del Dr. Alejandro García Carrancá en el laboratorio de Virus y Cáncer de la unidad de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología

“La ignorancia mata a los pueblos, por ello
es preciso matar la ignorancia”

José Martí

DEDICATORIA

Al camino de la vida en el que camino, encuentro y a veces desespero

A mi abuela que siempre está pendiente de mi caminar

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis, difícilmente habría podido llevarse a buen término sin las enseñanzas, ayuda, ánimo, paciencia y tolerancia, durante un buen número de años, de una gran cantidad de buenos amigos.

A los Dres. que fueron parte de mi comité tutorial. La Dra. Beatriz Gómez, Dra. Leticia Rocha, Dr. Luis Herrera y Dr. Luis Padilla; gracias por su asesoría, su guía y sus consejos para la formación de esta tesis.

Agradezco al Dr. Alejandro García Carrancá por haberme permitido realizar mi estancia en su laboratorio y por haberme apoyado a quedarme a hacer la tesis con él.

A mamá Miriam, por el tiempo que dedicó en mí, por su paciencia, por enseñarme todo lo que se ahora, porque al entrar al laboratorio, ella fue mi guía e hizo mi estancia más fácil. Por todo eso y por su gran amistad... muchas gracias.

A mamá Ángeles, por haberme asesorado cuando más lo necesité. Por su incondicional ayuda cuando llegó al laboratorio, en mis experimentos, en mis dudas, en sus consejos. Gracias a ella, ahora soy más ordenada. Ángeles... gracias por los buenos momentos.

A Silvia, por ser parte de mi proyecto, por tu asesoría, por tu gran ayuda y por los incontables favores que incondicionalmente hiciste por mí.

A la Dra. Laura Tirado por su asesoría y gran ayuda en el análisis de mis resultados.

A la Dra. Patricia Volkow por su asesoría y gran ayuda en la solución de mis dudas así como en su disposición en proporcionarme información que requerí.

A la indescifrable Dalia. Gracias por tu gran amistad, por tu “incondicional” ayuda (siempre a cambio de un chocolate), por tus consejos, tu asesoría, y sobre todo por los buenos momentos que me hiciste pasar (esa buena #%&?¿* en las calles de Vancouver...por siempre inolvidable). En fin, sin muchas palabras... gracias por ser tú. Que más te puedo decir a ti, sino que eres una gran amiga que trataré de conservar siempre.

A todos los que integran el laboratorio, que en algún momento me tendieron la mano, Martha, Alexandra, Valerio, Adriana, Hugo, Rocío, Alejandro. Por los buenos momentos, por las buenas borracheras, por la invaluable amistad. A todos... gracias.

A mis amigos de la carrera; los cuales sin ellos, habría sido imposible sobrellevar los malos momentos.

Raúl, Homero, Daniel, Néstor, David, Hugo...y tú Octavio, gracias por coincidir conmigo en esta loca y a la vez maravillosa vida. Gracias a la vida por haber unido diferentes caminos, por habernos puesto en un mismo punto, tiempo, lugar.

Gracias a todos ustedes por hacerme ver que la vida es mucho más que ser de “excelencia”.|

A Octavio por existir, por ser, por no ser, por tu palabra, por tu silencio, por tu presencia, por tu risa, por tu fe. Te sentiré hoy y siempre...

A toda la gente que no fue parte de la carrera pero que conocí en el transcurso de ésta. A toda esa gente...gracias por haberlas conocido, por las risas, los momentos, las enseñanzas... Tavo, fue muy bueno conocerte y mucho más que seas parte de mi vida.

Y no por menos importante quiero agradecer a toda mi familia, que a lo largo de este camino siempre ha estado ahí pendiente. Gracias por su constancia, su apoyo, su alegría.

A Adriana por su gran ayuda en la tesis. Por la compañía en la madrugada mientras imprimía o corregía. Por las risas, por la distracción...gracias.

A Sergio por su disposición de ayudarme en cualquier momento.

A Jaime por sus consejos, su asesoría y su incondicional apoyo que ha tenido a lo largo de mi carrera. Él, ahora forma parte de mi vida y quiero decirle que lo quiero mucho.

A Daniel por tu amor, tu tolerancia, tu apoyo, por tu disposición, por tu espera, por caminar conmigo. Porque se que al voltear en este largo camino...estás ahí. Siempre estarás ahí. Gracias.

A mi madre a la que también dedico esta tesis. Pasamos mucho tú y yo. Tiempos de separación y ansiedad. Más los momentos compartidos en los últimos tiempos me parecen ser los mejores de todos. Nunca te he dicho a ti, cuánto me alegra tenerte y cuánto valoro en mi vida tu presencia.

A Angélica porque sin ella hubiera sido imposible terminar este ciclo de mi vida. He aprendido que me está tomando mucho tiempo en convertirme en la persona que quiero ser. Sin embargo se que en este proceso tu estás ahí y seguirás ahí. Angie...muchas gracias.

A Emiliano por la magia que hay en ti, por tu ternura...porque simplemente te adoro.

A la última de esta gran lista y no la menos importante. A mi cómplice, mi guía, mi salvación, a la que no ha perdido nunca la fe en mí, a la que estuvo conmigo tantas y tantas madrugadas mientras estudiaba y que no se iba a dormir hasta que yo no terminara, a la que a esa hora me preparaba algo de comer si me daba hambre, a la que dedico esta tesis y todo el esfuerzo que le he puesto a la vida durante 26 años...a ti abuela, gracias por todo...por tu dedicación, por tu sacrificio, por tu desvelo, por tu tiempo. Por siempre estaré infinitamente agradecida. Te amo.

INDICE GENERAL

Indice general	i
Indice figuras	ii
Indice tablas	iii
Abreviaturas	iv
Resumen	v
Capítulo 1 Cáncer Cervicouterino	1
1.1 Epidemiología	1
1.2 Anatomía del cuello uterino	1
1.3 Histología	4
1.4 Factores de riesgo	6
Capítulo 2 VIRUS PAPILOMA HUMANO (VPH)	6
2.1 Propiedades de los papilomavirus (PVs)	6
2.2 Ciclo replicativo del VPH	9
2.3 Transformación por VPH	11
2.4 Oncogenes virales en la transformación viral	13
2.5 Historia del descubrimiento del VPH	14
2.6 VPH en el desarrollo de CaCU y lesiones precursoras	15
Capítulo 3 VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)	17
3.1 Epidemiología	17
3.2 Características generales del VIH	17
3.3 Curso de la enfermedad	20
3.4 Tratamiento del SIDA	21
Capítulo 4 Coinfección entre VIH Y VPH	23
4.1 Efectos del VIH en la historia natural de las infecciones por VPH	23
4.2 Impacto del tratamiento antiretroviral altamente activo (TARAA) sobre la infección por VPH y NIC	25
Capítulo 5 Planteamiento y justificación del problema	26
5.1 Hipótesis	26
Capítulo 6 Objetivos	27
6.1 Objetivo general	27
6.2 Objetivos específicos	27

Capítulo 7. MATERIALES Y METODOS	28
7.1 Universo de trabajo	28
7.2 Criterios de selección	28
7.2.1 Criterios de inclusión	28
7.2.2 Criterios de exclusión	28
7.3 Procesamiento y presentación de la información	28
7.4 Análisis de muestras	29
7.4.1 Análisis por Captura de Híbridos	29
7.4.2 Análisis por PCR	30
7.5 Secuenciación	32
7.6 Detección de Neoplasia Intraepitelial Cervical	32
Capítulo 8. RESULTADOS	33
Capítulo 9. DISCUSION	47
Capítulo 10. CONCLUSIONES	51
Capítulo 11. PERSPECTIVAS	51
Capitulo 12. REFERENCIAS	52
ANEXOS	60

INDICE FIGURAS

Figura 1.1 Anatomía del cuello uterino	2
Figura 1.2 Epitelio escamoso del cuello uterino	3
Figura 2.1 Estructura del Virus Papiloma Humano	7
Figura 2.2 Genomadel Virus Papiloma Humano	8
Figura 2.3 Modelo para la interacción de E6-E7 de VPH con el daño al ADN	13
Figura 3.1 Estructura del Virus Inmunodeficiencia Humana	18
Figura 3.2 Historia natural de la infección por VIH-1	20
Figura 7.1 Esquema de la metodología del ensayo de captura de híbridos	29
Figura 7.2 Foto que muestra el kit colector para la toma de la muestra	30
Figura 8.1 Resultado de la citología cervicovaginal papanicolau, realizadas a Las pacientes VIH-1+ con terapia antiretroviral (N=77)	37
Figura 8.2 Resultado de la colposcopia realizada a las 77 pacientes que incluye El estudio	37
Figura 8.3 Resultado de la biopsia realizada a 26 pacientes con tratamiento Antiretroviral	38
Figura 8.4 Correlación entre la prevalencia de NIC y grado de inmunosupresión	39

Figura 8.5	Foto de gel de agarosa al 1.5% y teñido con bromuro de etidio	41
Figura 8.6	Resultado del análisis de ADN viral por el método de captura de híbridos	41
Figura 8.7	Resultado de la secuenciación realizada a 36 productos de PCR de Muestras de pacientes VIH-1+ con terapia antiretroviral	42
Figura 8.8	Cromatograma de secuencias de VPH de pacientes VIH-1+	44
Figura 8.9	Correlación entre los niveles de VPH-AR y el grado de inmunosupresión	45

INDICE TABLAS

Tabla 1.1	Clasificación de las lesiones premalignas del cuello	5
Tabla 2.1	Función de las distintas regiones del genoma de VPH	9
Tabla 2.2	Clasificación de tipos de papilomavirus humanos asociados con cáncer cervical	15
Tabla 8.1	Diferencias entre los dos grupos de estudio	33
Tabla 8.2	Características sociodemográficas de la población	34
Tabla 8.3	Características de la población	35
Tabla 8.4	Niveles de CD4 en pacientes VIH-1+ bajo tratamiento TARAA	36
Tabla 8.5	Resultado del análisis de la prevalencia de VPH en mujeres Infectadas con VIH-1 que estaban bajo tratamiento antiretroviral (N=77) por los métodos de PCR y CH2	40
Tabla 8.6	Resultado de la secuenciación de los 36 productos de PCR de pacientes con TARAA	43
Tabla 8.7	Comparación de pacientes con TARAA vs. sin TARAA por no Requerirlo	46

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASC-US	Atipia de células escamosas, de significado no determinado
BPV-1	Virus Papiloma Bovino-1
CA	Condiloma acuminado
CaCU	Cáncer Cervicouterino
CDC	Centro para el Control de Enfermedades
CENSIDA	Centro Nacional para la Prevención y el Control del SIDA (México)
CIS	Carcinoma in situ
CV	Carga viral
E1...E8	Regiones de expresión temprana comunes a los VPHs (Early (E))
FONSIDA	Fondo Nacional para las personas que viven con el VIH/SIDA (México)
HC2	Captura de híbridos de segunda generación
HSIL	Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (NIC2 y NIC3)
HSV	Virus del herpes simple
IARC	Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer
IVSA	Inicio de Vida Sexual Activa
L1, L2	Regiones de expresión tardía comunes a los VPHs (Late (L))
LCR	Región de control de la expresión de genes de VPH (Long Control Región)
LIAG	Lesión intraepitelial alto grado
LIBG	Lesión intraepitelial bajo grado
LSIL	Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (NIC I)
NIC (I-III)	Neoplasia Intraepitelial Cervical I-III
NRTI	Inhibidor de la transcriptasa reversa análogo nucleósido
NNRTI	Inhibidor de la transcriptasa reversa no nucleósido
ONUSIDA	Programa de Naciones Unidas en VIH/SIDA
ORF	Pauta de lectura abierta (Open Reading Frame)
p53	Proteína Tumor Supresora p53
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PV	Papilomavirus
PVVS	Personas que viven con VIH/SIDA
Rb	Gen Tumor Supresor descubierto en Retinoblastoma
RHNM	Registro Histopatológico de Neoplasias en México
RLU	Unidad Relativa de Luz
RT	Transcriptasa reversa
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SIL	Lesión escamosa intraepitelial
TARAA	Tratamiento Antiretroviral Altamente Activo
T CD4+	Linfocito T CD4
Th	Linfocitos T ayudadores
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VLP	Partículas semejantes a virus
VPH	Virus de papiloma humano
VPH-AR	Virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico
VPH-BR	Virus de papiloma humano de bajo riesgo oncogénico

PONENTE: Pasante. FABIOLA MARTINEZ QUEZADA

ASESOR: DR. ALEJANDRO GARCIA CARRANCA

TITULO: Prevalencia del virus del papiloma humano en mujeres infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana.

INTRODUCCION: La infección por el virus del papiloma humano (VPH) es un evento necesario en la patogénesis de la neoplasia intraepitelial (NIC) y del cáncer cervical invasor. (CaCU)

La inmunodeficiencia es el factor de riesgo más fuertemente asociado al desarrollo de esta neoplasia. El VIH/SIDA es la causa actual más importante de inmunodeficiencia en el mundo. Se ha demostrado que la mujer VIH+ tiene mayor riesgo de infección por VPH y VPH de alto riesgo (VPH-AR) y de NIC.

OBJETIVO: Determinar la prevalencia de infección cervical por el virus del papiloma humano y neoplasia intraepitelial cervical en mujeres infectadas con VIH-1 que se encuentren bajo tratamiento antiretroviral altamente activo (TARAA) o sin tratamiento por no requerirlo.

MATERIALES Y METODOS: Se realizó un estudio en mujeres VIH+ con TARAA, se les practicó examen ginecológico completo, toma de citología cervical, colposcopia con biopsia dirigida (criterio de Coppleson) y se determinó la prevalencia de infección cervical por VPH de alto y bajo riesgo y carga viral por captura de híbridos (HC2) y PCR para cualquier tipo de VPH. Las muestras positivas a ADN viral fueron llevadas a secuenciación para determinar el tipo de VPH.

RESULTADOS: Se incluyeron 89 mujeres en el estudio, 12 sin tratamiento por no requerirlo y 77 con TARAA en las cuales se realizó el análisis. La prevalencia de ADN de VPH por los métodos de PCR y HC2 para cualquier tipo de VPH fue de 76.6%. Por el método de PCR, seis muestras resultaron inadecuadas para el análisis. ADN viral se detectó por PCR en 49 de 71 casos (69%). Usando HC2 (HC system II Digene; Gaithersburg, MD USA) el VPH de alto riesgo fue detectado en 25 casos (32%). VPH de bajo riesgo fue detectado en 4 casos (5%). 24 (31.20%) muestras fueron positivas para ambos tipos virales (alto y bajo riesgo). Se realizó biopsia a 26 pacientes, 22 (28.5%) de ellas tuvieron NIC; 8 (10.3%) tuvieron NIC II-III y 14 (18.8%) tuvieron NIC I. Se detectó VPH de alto riesgo en el 100% y 85.7% de las lesiones respectivamente. Se realizó secuenciación de los productos de PCR de diversas pacientes encontrando diversos tipos de VPH de alto riesgo (VPH-AR) y en la gran mayoría de las muestras se encontraron infecciones múltiples.

CONCLUSIONES: La prevalencia de VPH-AR y NIC sigue siendo alta en mujeres VIH+ en la era de TARAA. Encontramos una fuerte asociación inversa entre el grado de inmunosupresión y el riesgo de infección por VPH-AR y NIC. Estas pacientes deben ser sometidas a programas de detección regular para diagnóstico temprano de lesiones premalignas y prevención de cáncer cervical invasor.

1. CANCER CERVICO UTERINO (CaCU)

1.1 Epidemiología

En el año 2000, se calculó que habría 500 000 casos nuevos de carcinoma del cuello uterino (cáncer cervicouterino/ CaCU) entre las mujeres de todo el mundo. Además se calculó que más del 80% de esta carga se presentaría en los países menos desarrollados, donde esta enfermedad es la principal neoplasia maligna entre las mujeres (1).

A nivel mundial el CaCU ocupa el segundo lugar en frecuencia en la población femenina.

En el continente Americano, se pronosticaron 92 136 casos y 37 640 defunciones por CaCU, de las cuales 84% y 81% respectivamente corresponderían a América Latina y el Caribe (2) presentando algunas de las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer cervicouterino más altas del mundo, sólo superadas por las de África Oriental.

En México en el año 2000, se diagnosticaron 16 448 casos nuevos de CaCU; ese año fallecieron 6650 mujeres a consecuencia de esta enfermedad que continua siendo la primera causa de muerte por cáncer en mujeres en el país (2).

México presenta una tasa de incidencia de cáncer cervical con una incidencia estandarizada por edades de 40.5 casos por 100,000 mujeres (2).

Esta enfermedad tiene una historia natural de evolución larga que inicia con los cambios en el epitelio cervical (displasias), que gradualmente van acentuándose hasta que en un término de 15 a 20 años se transforman en carcinoma invasor.

Se sabe que estos cambios están relacionados con la presencia del virus del papiloma humano (VPH). No todas las displasias evolucionan al cáncer. Algunos estudios han demostrado que la displasia leve puede evolucionar al carcinoma *in situ* (CIS) en 5 a 7 años en promedio, que se requieren de 10 a 13 años en promedio para su progresión a cáncer microinvasor y de éste a invasor dos años más (Revisado en 3).

1.2 Anatomía del cuello uterino

El cuello uterino es la parte inferior del útero. De forma cilíndrica o cónica, mide de 3 a 4 cm. de longitud y 2.5 cm. de diámetro, aunque su tamaño varía según la edad, el número de partos y el momento del ciclo menstrual de la mujer.

El conducto cervical desemboca en la vagina por el llamado orificio cervical externo. (Figura 1.1) La porción del cuello uterino exterior al orificio externo se llama exocérvix. Es la parte más fácilmente visible del cuello uterino. La porción del cuello uterino interior al orificio externo se denomina endocérvix, en gran parte no visible.

Normalmente el exocérvix está recubierto en gran parte por epitelio escamoso estratificado no queratinizante que contiene glucógeno (4).

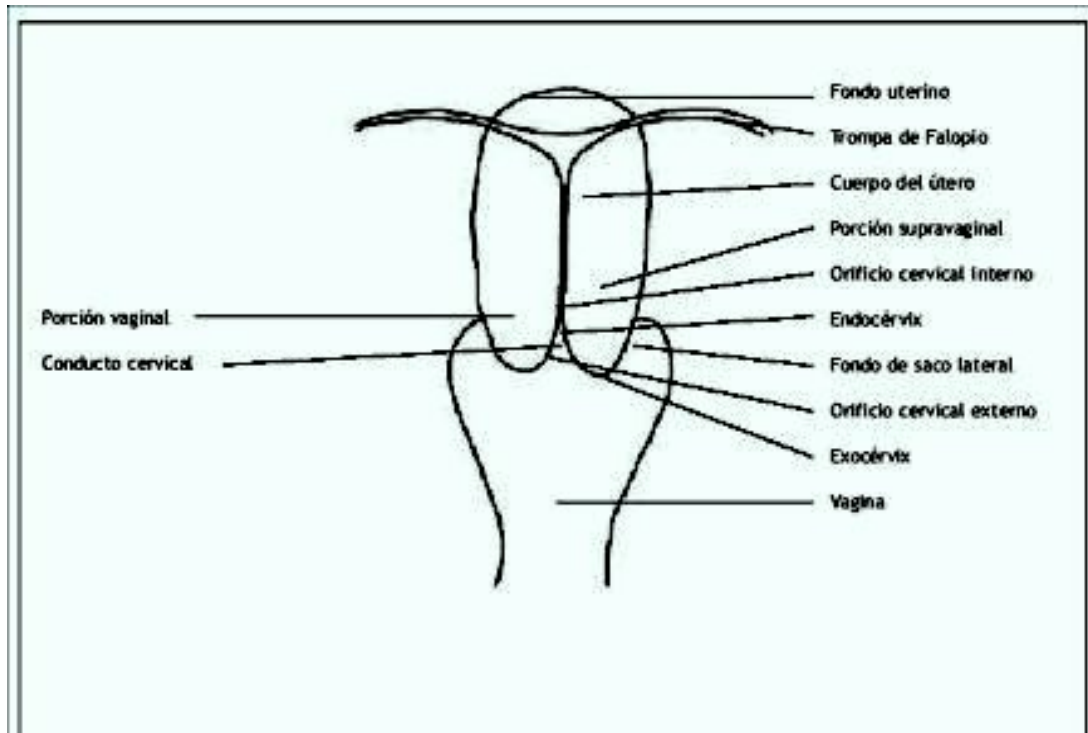


Figura 1.1. Anatomía macroscópica del cuello uterino. Imagen tomada de <http://www.iarc.fr/colpo>

La arquitectura histológica del epitelio escamoso del cuello uterino presenta en el fondo, una capa única de células basales redondas con núcleos grandes de coloración oscura; (teñidos con una combinación de colorantes hematoxilina y eosina que se utilizan habitualmente en histología) y poco citoplasma, pegadas a la membrana basal. (Figura 1.2)

Las células basales se dividen y maduran para formar las siguientes capas celulares llamadas parabasales. Estas células siguen diferenciándose y madurando hasta constituir capas intermedias de células con citoplasma abundante y núcleos redondos pequeños. Al proseguir la maduración se forman las células grandes y planas, de núcleo pequeño y citoplasma transparente (4).

La presencia de glucógeno en las capas intermedia y superficial es signo de maduración normal y de desarrollo del epitelio escamoso.

El conducto cervical está recubierto de epitelio cilíndrico, a veces denominado epitelio glandular.

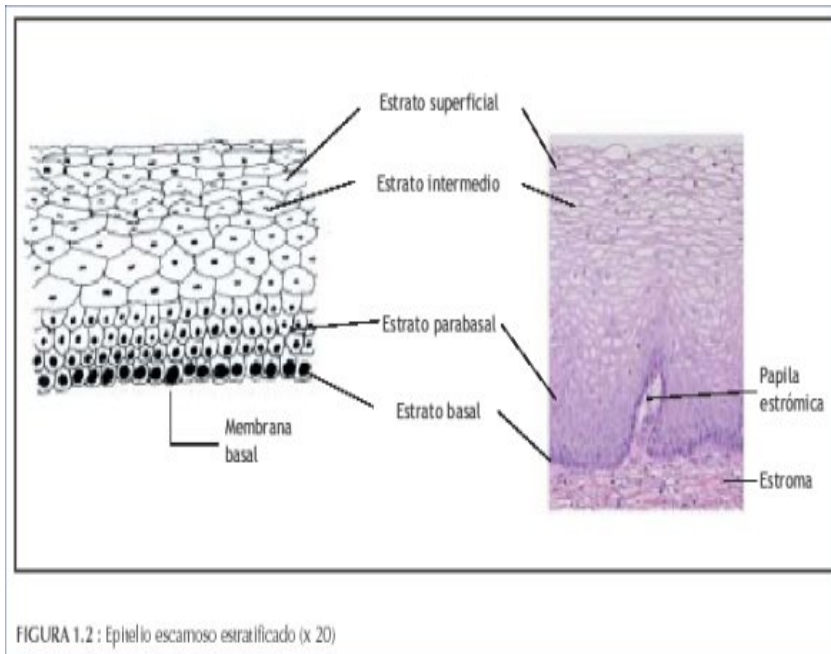


Figura 1.2. Epitelio escamoso del cuello uterino. Imagen tomada de <http://www.iarc.fr/>

La ubicación de la unión escamoso-cilíndrica con relación al orificio cervical externo varía según la edad, el momento del ciclo menstrual y otros factores como el embarazo y el uso de anticonceptivos orales (4).

Por ectropión entendemos la eversión del epitelio cilíndrico sobre el exocérnix, cuando el cuello uterino crece rápidamente y se agranda por influencia estrogénica, a partir de la menarquía y en el embarazo.

La metaplasia escamosa del cuello uterino consiste en el reemplazo fisiológico del epitelio cilíndrico evertido al exocérnix por un epitelio escamoso neoforado de células de reserva subyacentes a las cilíndricas.

La parte del cuello uterino en la que se produce metaplasia escamosa se denomina zona de transformación (4).

Identificar la zona de transformación tiene gran importancia en la colposcopia, pues casi todas las manifestaciones de carcinogénesis cervical ocurren en esta zona.

1.3 Histología

El cáncer cervical se manifiesta en distintos tipos histológicos cuya nomenclatura se basa en su comportamiento.

La información obtenida del Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas en México (RHNM) señala que la variante histológica más frecuente en México es el carcinoma de células escamosas (91.5%), al que le siguen en orden de importancia el adenocarcinoma (3.7%) y otras variedades menos frecuentes, entre las que se encuentra el carcinoma de células pequeñas (5).

El concepto y la terminología de las alteraciones premalignas del epitelio cervical, han evolucionado paralelamente al avance del conocimiento de su biología e historia natural.

Inicialmente se describió el carcinoma *in situ* (CIS), para denotar las lesiones en las cuales las células carcinomatosas indiferenciadas abarcaban todo el espesor del epitelio, sin interrumpir la membrana basal.

Ulteriormente se comunicó la asociación entre CIS y cáncer invasor del cuello uterino. En la década de los cincuenta se determinó displasia para designar la atipia epitelial cervical intermedia entre el epitelio normal y el CIS. La displasia se categorizó en tres grupos: leve, moderada y pronunciada, según el grado de afectación de la capa epitelial por las células atípicas (6).

Clasificar separadamente la displasia y el CIS fue considerado arbitrario sobre la base de los resultados de algunos estudios de seguimiento de las mujeres con esas lesiones. Se observó que algunos casos de displasia retrocedían, algunos persistían y otros progresaban. Se observó una correlación directa entre progresión y grado histológico. Estas observaciones condujeron al concepto de que el epitelio normal evoluciona a lesiones epiteliales precursoras y a cáncer invasor. Sobre la base de dichas observaciones, en 1968 se introdujo el término de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) para denotar las múltiples posibilidades de atipia celular confinada al epitelio. La NIC se dividió en los grados I (displasia leve), II (displasia moderada) y III (displasia grave y el CIS) (7).

La hipertrofia nuclear y los cambios de tamaño y forma son características constantes de todas las células displásicas. Estas células siempre presentan distribución irregular de la cromatina, como en grumos.

En la NIC I existe buena maduración, con mínimas anomalías nucleares y pocas figuras mitóticas. Pueden verse cambios citopáticos debidos a la infección por el VPH en todo el espesor del epitelio (coilocitos).

La NIC II se caracteriza por anomalías nucleares más marcadas que en la NIC I. Pueden verse figuras mitóticas en toda la mitad inferior del epitelio.

En la NIC III la diferenciación y la estratificación pueden faltar por completo. Se ven figuras mitóticas abundantes y muchas de ellas tienen formas anormales.

Esta terminología sigue empleándose en la actualidad en el diagnóstico histológico.

En 1989 se propuso el sistema Bethesda para describir las alteraciones citológicas incluyendo nuevos conceptos sobre infección por el VPH. En este sistema Bethesda se sustituye el término neoplasia por el de lesión escamosa intraepitelial (SIL), con dos categorías: bajo grado (LSIL), que corresponde a displasia leve o NIC I y alto grado (HSIL), que incluye displasia moderada o NIC II y displasia severa o NIC III. En la tabla 1.1 se expresan las equivalencias entre las diferentes clasificaciones.

En el año 2001 se ha revisado y modificado ligeramente dicha clasificación. Se ha creado una nueva categoría de lesiones limítrofes: células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS). Estos cambios han resultado en un aumento proporcional de lesiones de bajo grado (LSIL) las que, combinadas con ASCUS; dan cuenta de hasta el 30% de los frotis (Revisado en 8).

Las lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado o NIC I se atribuyen a tipos de VPH de alto y bajo riesgo, con el 30% conteniendo más de un tipo de VPH, y menos del 10% albergando solo tipos de bajo riesgo y el 60% albergando tipos de alto riesgo. El ADN viral se encuentra en su forma episomal y hay una baja expresión de las oncoproteínas E6 y E7. Un 25% progresará a lesiones de alto grado y la mayoría se resolverán espontáneamente (9).

Se ha postulado que las lesiones intraepiteliales de alto grado pueden surgir de una displasia leve o directamente de una infección de VPH de alto riesgo. Las SILs de alto grado albergan VPHs de alto riesgo en un 90% de los casos, con alta expresión de las oncoproteínas E6 y E7 (9).

Tabla 1.1. Clasificación de las lesiones premalignas del cuello

	Años 1950-69 (Reagan)	Años 1970-89 (Richart)	Años 1990-actualidad (Bethesda)
Displasia	leve	NIC I	SIL bajo grado (LSIL)
	moderada	NIC II	} SIL alto grado (HSIL)
	pronunciada	} NIC III	
	carcinoma in situ		

1.4 Factores de riesgo

Los factores de riesgo asociados tanto al CaCU como a las lesiones precursoras son: el número de parejas sexuales, la edad del primer contacto sexual, sexo con hombres que han tenido múltiples parejas (10).

El modelo propuesto de que el CaCU es una enfermedad de tipo venéreo condujo a la búsqueda molecular y epidemiológica del agente o agentes infecciosos causantes del CaCU.

A finales de los sesentas y principios de los setentas se propuso al virus del herpes (HSV) como el agente etiológico del CaCU. Aunque el HSV probó ser carcinogénico *in vitro e in vivo*, estudios clínicos demostraron eventualmente que solo una fracción de carcinomas cervicales contenía rastros de ADN de HSV y los resultados epidemiológicos fueron inconsistentes con el papel del HSV en el CaCU (11).

Así, han sido varios los agentes de transmisión venérea que han sido implicados en diferentes momentos en la etiología del cáncer de cérvix. Sin embargo, actualmente se considera al VPH como el agente más importante en la etiología del CaCU (12).

2. VIRUS PAPILOMA HUMANO

2.1 Propiedades de los papilomavirus (PVs)

Los PVs comprenden un grupo de virus que inducen lesiones benignas en la piel (verrugas) y mucosa en seres humanos y en varias especies animales. Se ha visto que algunos PVs humanos tienen potencial oncogénico. Los PVs son especie-específicos y se encuentran en muchas especies de vertebrados desde las aves hasta el hombre. Tienen forma icosaédrica y contienen un genoma circular de doble cadena de ADN. El ADN circular de los virus consta de 8,000 pb contenido dentro de una cápside compuesta de 72 capsómeros pentaméricos. Figura 2.1

La mayoría de los papilomavirus están clasificados de acuerdo a su especie de origen y a la homología en su secuencia (clasificación basada en la comparación en la secuencia de nucleótidos de un segmento de L1). Han sido divididos en 5 clados o subgrupos, designados A, B, C, D y E. Los papilomavirus de animales se encuentran en cada uno de los 5 subgrupos mientras que los VPH se encuentran en tres de ellos.

En los seres humanos existen más de 100 tipos de los cuales cerca de 40 infectan el epitelio del tracto anogenital (13).

La clasificación de los tipos virales se lleva a cabo por la comparación en la secuencia de nucleótidos de regiones específicas del genoma viral. Basados en el Comité de Nomenclatura de Papilomavirus, la secuencia nucleotídica de E6, E7 y L1 de un nuevo tipo viral no debe exceder del 90% con las secuencias correspondientes de otros VPH conocidos.

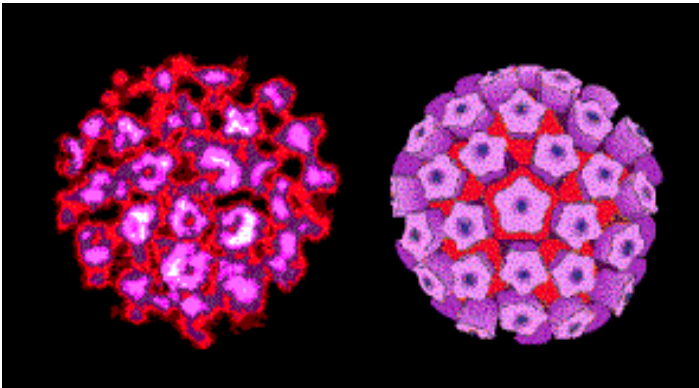


Figura 2.1. Estructura del Virus Papiloma Humano

Todos los VPH caracterizados se vinculan con lesiones confinadas a las capas epiteliales de la piel o las mucosas oral, faríngea, respiratoria y anogenital. A pesar de su variedad, todos los virus del papiloma animal y humano parecen compartir una organización genética similar aunque con diferencias, tanto en las funciones de los genes virales como en su regulación.

El genoma de VPH puede dividirse en tres regiones: (figura 2.2)

1. Una región reguladora denominada región larga de control (LCR) que tiene secuencias de control para la replicación y expresión genética de VPH.
2. Una región temprana (E) que codifica para proteínas virales involucradas en la replicación del ADN viral, la regulación de la transcripción y la transformación. La región temprana del genoma viral está expresada en células infectadas no productivamente.
3. Una región tardía (L) que codifica para las proteínas de la cápside viral L1 y L2.

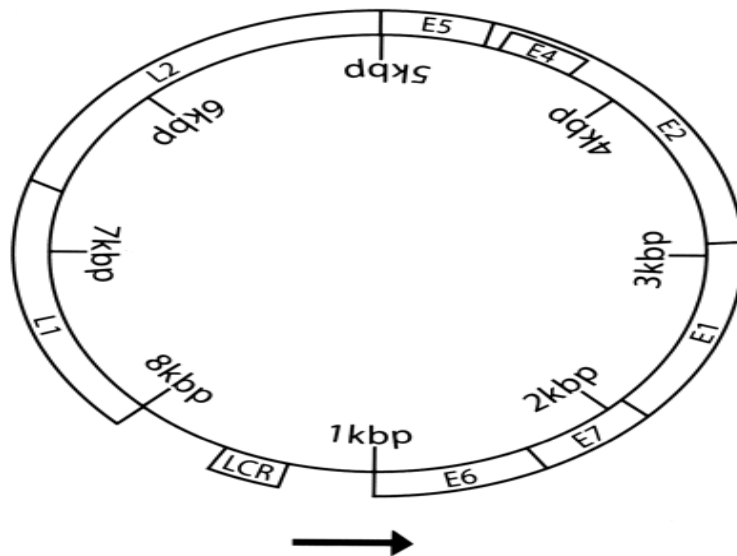


Figura 2.2. Genoma del Virus Papiloma Humano mostrando los genes tempranos (E=early) y tardíos (L=late)

La transcripción genética tardía está vinculada íntimamente al programa de diferenciación de las células del huésped. Los ORFs de L1 y L2 codifican para las proteínas de la cápside y están expresados solamente en células infectadas productivamente. La síntesis y expresión elevadas de ADN viral de los genes L1 y L2 solo ocurre en las capas superiores de la piel. Esta división funcional se basa en los estudios genéticos llevados a cabo en el virus de papiloma bovino (BPV-1) (14). En tejidos con infecciones que producen partículas virales de VPH (como es el caso de las verrugas), el ARN mensajero se transcribe tanto de la región temprana como de la región tardía del genoma. En infecciones que no producen partículas virales (como se observa en las células de la capa inferior del epitelio en una verruga), el ARNm solo se transcribe de la región temprana del genoma (15).

En la tabla 2.1 se muestra una lista de algunas funciones asignadas a las distintas regiones del VPH.

TABLA 2.1. Función de las distintas regiones del genoma del VPH

GEN	PRODUCTO	FUNCION Y PROPIEDADES
L1	Proteína L1	Constituyente principal de la cápside (80% de proteína viral)
L2	Proteína L2	Minoritaria de la cápside, ensamblaje de los viriones
E1	Proteína E1	Inicio de la replicación del ADN viral, helicasa ATPasa
E2	Proteína E2	Proteína reguladora de la transcripción, auxiliar en la replicación
E4	Proteína E4	Localizada en región temprana y expresada como proteína tardía. Papel en la infección productiva.
E5	Proteína E5	Transformante, asociada a membrana, interacciona con receptores de factores de crecimiento
E6	Proteína E6	Transformante, promueve la degradación de p53; activa a la telomerasa
E7	Proteína E7	Transformante; se une a la proteína de retinoblastoma, p130 y c-jun; activa la transcripción
LCR		Secuencia reguladora de la transcripción temprana; contiene el origen de replicación viral y elementos de respuesta a diversos factores, entre ellos hormonas

Ref. (16)

2.2 Ciclo replicativo del VPH

Aunque la naturaleza viral de los PVs fue demostrada hace algún tiempo, el estudio de éstos ha sido difícil ya que estos virus crecen de manera óptima solamente en su huésped natural, son difíciles de propagarse *in vitro*.

La inhabilidad de crecer en cultivo se debe a que la regulación de la expresión viral está estrechamente ligada al programa de diferenciación de la célula epitelial (16).

La llegada de la clonación molecular rodeo la inhabilidad de estudiar al papilomavirus en cultivo, ya que ésta permitió estudiar las propiedades biológicas del virus y permitió determinar la función de los oncogenes virales (16).

La disponibilidad de clonar ADN plasmídico de muchos PVs, incluyendo VPHs, hace posible realizar transfecciones para el estudio de la replicación viral.

El BPV-1 fue el virus estándar para el inicio de estos estudios, siguiendo después con la clonación de varios papilomavirus humanos.

Se ha mostrado que el ciclo replicativo del PV puede estudiarse en cultivo. Técnicas especializadas de cultivo han sido desarrolladas resultando en la fiel reconstrucción de una epidermis (17). De igual manera, los modelos de estudio son el BPV-1 y algunos VPH (VPH 16 y 18).

La infección productiva de las células por el VPH puede ser dividida en etapas tempranas y tardías. Estas etapas están ligadas al programa de diferenciación de la célula epitelial infectada; el queratinocito, con producción de viriones restringida a células epiteliales bien diferenciadas.

Los papilomavirus tienen tres modos de replicación. El primero ocurre durante la infección inicial del virus en la célula basal, la cual es mitóticamente activa. El receptor para los PVs no ha sido claramente identificado. Sin embargo, un posible candidato es el receptor de integrina $\alpha 6\beta 4$ que se encuentra en las células epiteliales (18). Otro posible candidato para receptor es el heparan sulfato que media la unión inicial del virus a la célula (19).

Las células de la lámina basal son células que están continuamente dividiéndose y son un fuerte reservorio de células para las regiones del epitelio.

La infección por VPH en estas células conduce a la activación de una cascada de expresión genética viral que resulta en una amplificación del genoma viral de aproximadamente 20-100 copias por célula (20).

La segunda fase es la del mantenimiento del genoma viral, la cual ocurre en la célula basal en división, en la capa inferior de la epidermis. En estas células el ADN viral se mantiene en forma de plásmido. El genoma se replica; en promedio, una vez por ciclo celular durante la fase S; es decir, en sincronía con el cromosoma celular. Este tipo de replicación asegura una persistente y latente infección en la célula basal de la epidermis (21).

El tercer tipo de replicación es la replicación vegetativa del ADN la cual ocurre en las células epiteliales terminalmente diferenciadas del papiloma. Este tipo de replicación es necesaria para generar genomas que sean empacados en viriones. Por lo tanto aquí puede observarse un incremento en las síntesis de ADN viral.

Conforme la célula infectada avanza en su estado de diferenciación, los genes virales van expresándose. Las primeras proteínas virales que se expresan son factores de replicación, E1 y E2. Estas proteínas forman un complejo que se une al origen de replicación viral y actúan reclutando polimerasas celulares y proteínas accesorias que median la replicación (22). Las proteínas E6 y E7 de VPHs de alto riesgo actúan como oncoproteínas virales. Sin embargo, esta función no está asociada para estas mismas oncoproteínas de VPHs de bajo riesgo. E6 de VPH de alto riesgo se une a p53 promoviendo su degradación y E7 de VPH de alto riesgo se une a pRb así como a otras proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular.

Al dividirse la célula basal infectada, el genoma viral es repartido en las células hijas, una de las cuales es desprendida de la lámina basal y migra hacia el epitelio granuloso donde sufre diferenciación. Esta célula infectada, al dejar la lámina basal permanecerá activa en el ciclo celular debido a la acción de E7 (23).

En cambio, en el epitelio normal no infectado, las células salen del ciclo celular al abandonar la lámina basal lo que resulta en la pérdida del núcleo.

Las células infectadas reentran a la fase S en células bien diferenciadas y activan la expresión de factores de replicación necesarios para la replicación viral. La presencia de E7 conduce a la retención del núcleo a través de todas las capas del epitelio infectado (20). La función de E4 y E5 no está aún bien clara; sin embargo ambas han sido propuestas en la regulación de funciones virales tardías (24).

La expresión de los genes tardíos (L1 y L2) ocurre en células epiteliales bien diferenciadas. La replicación vegetativa del ADN viral, alta expresión de proteínas virales y el ensamblaje de partículas virales ocurren en las células de las capas superiores de la epidermis. Después del ensamblaje de los viriones, éstos son liberados de las capas superiores de la epidermis (20).

2.3 Transformación por VPH

La habilidad de inducir papilomas, el cual es característica de los papilomavirus, se deriva de su capacidad para alterar las características normales de crecimiento del epitelio infectado. Los estudios donde han examinado las características biológicas y bioquímicas de los oncogenes virales y las proteínas que codifican han concluido que 3 oncoproteínas: E5, E6 y E7 perturban el crecimiento normal de la célula por diferentes mecanismos (Revisado en 25).

Los estudios de transformación por papilomavirus se realizaron con el virus de papiloma bovino (BPV-1) (26). Sin embargo, estos trabajos no se han limitado a este virus. La mayoría de los estudios posteriores han sido efectuados con VPH tipo 16 y 18, dado que éstos se asocian con CaCU. Así, se ha mostrado que los VPH de alto riesgo como VPH 16 y VPH 18 son virus con capacidad transformante (27) mientras que los VPH de bajo riesgo como VPH 6 y VPH 11 no lo son. Esto ha permitido el mapeo de los genes virales directamente involucrados en la transformación celular E6 y E7 de los VPH de alto riesgo.

El ADN de los VPH de alto riesgo puede también ser distinguido del ADN de los VPH de bajo riesgo por la habilidad de los tipos de alto riesgo de inmortalizar cultivos primarios de fibroblastos humanos y células epiteliales de cérvix (28). Las líneas celulares resultantes no son dependientes de anclaje, presentan alteraciones en sus propiedades de crecimiento y son resistentes en la respuesta a señales de diferenciación.

Todos los VPH que infectan el tracto genital (VPH-6, VPH-11, VPH-16, VPH-18, etc.) son capaces de inducir temporalmente, proliferación celular. Solamente los VPH de alto riesgo son capaces de extender el tiempo de vida de las células y dar origen a líneas celulares inmortalizadas las cuales son intratables a señales de diferenciación (29).

Aunque el ADN viral permanece exclusivamente en forma episomal en los papilomas benignos, la integración del genoma viral está presente en la mayoría de los cánceres cervicales (30). La integración ocurre a menudo en conjunto con el desarrollo de displasia de alto grado, la cual también se encuentra asociada con un incremento en la expresión de los genes virales en células basales. Los oncogenes virales E6 y E7 y la región larga de control (LCR) se encuentran preferencialmente retenidos y expresados en muchas displasias así como en lesiones malignas.

Por otra parte, la integración del genoma viral al cromosoma hospedero se asocia con el rompimiento de los genes E1 o E2 (31).

La proteína E2 es un factor regulador muy importante capaz de activar o reprimir la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7 (32) uniéndose a secuencias localizadas en el LCR de todos los VPH. La integración del genoma viral al cromosoma hospedero se ha propuesto como un mecanismo de progresión de las lesiones intraepiteliales a cáncer cervical ya que la integración provoca la pérdida de E2 y por consecuencia un aumento en la expresión de E6 y E7, aunque se reporta que este requisito no es indispensable en todos los casos (31). Datos clínicos y moleculares sugieren que el VPH-16 Y VPH-17 se comportan diferente. Tumores infectados con VPH-18 generalmente muestran integración del genoma viral en el genoma celular mientras que en tumores infectados con VPH16, el virus no siempre está integrado. El comportamiento de los tumores con VPH-18 con copias virales relativamente bajas coincide con el rompimiento de E1-E2 al momento de integrarse el genoma viral evidenciando una relación entre la integridad de E1-E2 y el número de copias virales. Así mismo se observa un número alto de copias virales con la retención de E1-E2 y la baja frecuencia de integración del VPH-16 (31).

2.4 Oncogenes virales en la transformación viral

Estudios experimentales con genomas de VPH y con genes virales en particular enfatizan la gran importancia de las actividades biológicas de los VPHs de alto riesgo comparada con los VPHs de bajo riesgo, especialmente el rol de E6 y E7. Así, los genes de E6 y E7 de VPH de alto riesgo colaboran para interferir con el crecimiento normal de la célula y con los puntos de control en el ciclo celular (checkpoints) (33). (Figura 2.3) Análisis mutacionales y bioquímicos de las proteínas codificadas por E6 y E7 han aclarado algunos de los mecanismos por lo que estos genes actúan. Las proteínas E6 de VPH de alto riesgo inactivan P53, mientras que las proteínas E7 de VPH de alto riesgo se unen e inactivan a pRB (34).

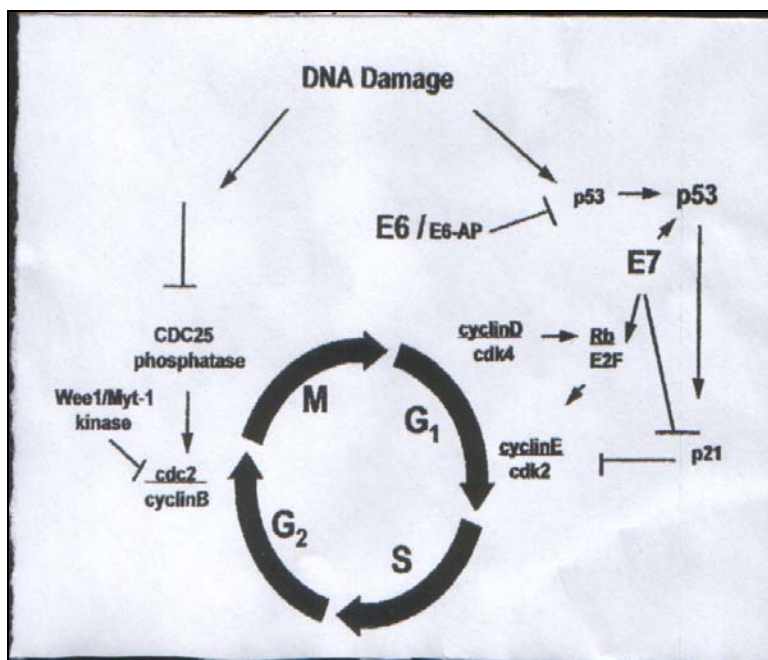


Figura 2.3. Modelo para la interacción de E6-E7 de VPH con el daño al ADN. El daño a ADN induce una detención en el ciclo celular en G1 y G2. E6 elimina p53 para pasar de esta detención en G1. E7 pasa esta interrupción en G1 inactivando pRb e inhibiendo el inhibidor de cdk, P21. Imagen tomada de referencia 29

La proteína p53 es un factor de transcripción que tiene la habilidad de regular una serie de genes, orquestar una respuesta celular a estrés genotóxico y citotóxico para preservar la integridad genómica y el crecimiento normal de la célula. Entre las proteínas que regula se encuentra la ciclina p21; la cual, cuando hay un daño al ADN, p53 se activa e induce expresión de p21 lo que resulta en un arresto del ciclo celular así como en apoptosis (35).

E6 interfiere con la función de p53 induciendo su degradación por ubiquitinización, una función que está mediada por la ligasa de ubiquitina E6-AP (36).

Sin embargo, E6 puede también interferir de manera más directa con la actividad de p53 por otros mecanismos. Estos incluyen la habilidad de E6 de inhibir la interacción de p53 con sus sitios de unión al ADN y la habilidad de E6 de unirse a p300/CPB, el cual es un coactivador de p53 (37). Otra función de las proteínas E6 de VPHs de alto riesgo y que es importante para la inmortalización, es su habilidad para activar la telomerasa (38).

Las proteínas E7 de los virus de alto riesgo contribuyen a la progresión carcinogénica, al menos en parte mediante su interacción con pRB. Como consecuencia de esta interacción ocurre la disociación del complejo formado por pRB y el factor de transcripción E2F-1 (39). Posteriormente la liberación de E2F-1 de estos complejos, activa la expresión de ciertos genes lo que permite la progresión del ciclo celular hacia la fase S (síntesis de ADN).

2.5 Historia del descubrimiento del VPH

La naturaleza infecciosa de las verrugas fue demostrada inicialmente en 1907 por Ciuffo, al transmitir la enfermedad usando extractos de verrugas libres de células. El primer papilomavirus fue identificado en los años 30s por Richard Shope, quien identificó y caracterizó la naturaleza transmisible de los papilomas provenientes del conejo (cottontail rabbit).

En 1922 Lewandowsky y Lutz describieron una condición hereditaria muy extraña, la epidermodisplasia verruciforme, caracterizada por verrugas atípicas que cubrían largas áreas de la piel. La naturaleza infecciosa de estas verrugas fue demostrada por Jablonska y sus colegas en 1972, también por la transmisión usando extractos libres de células (16).

La llegada de la clonación molecular en los 70s inició el estudio de los papilomavirus. Esta técnica hizo posible evitar parcialmente la inhabilidad de estudiar al papilomavirus en cultivo, ya que la clonación permitió estudiar sus propiedades biológicas y bioquímicas y permitió determinar la función de los genes virales incluyendo muchos oncogenes virales.

Fue en esta década cuando se reconoció que los VPH podrían tener un papel en el desarrollo de las neoplasias cervicales. El ADN del primer VPH genital que se describió fue el de VPH-6 por Gissman en 1980 (40), el cual se detectó en una verruga genital, posteriormente se clonó y caracterizó. Esto permitió primero el aislamiento del ADN de un VPH muy relacionado (VPH-11) en papilomas de laringe y de verrugas genitales y después, el ADN de dos tipos virales lejanamente relacionados, el VPH-16 y el VPH-18, directamente de biopsias de cáncer de cérvix (41).

A pesar de que en 1976 el propio zur Hausen ya había postulado que los VPH podrían tener algún papel importante en el desarrollo de cáncer anogenital, fue el aislamiento del ADN de los VPH tipos 16 y 18 lo que dio la base para los estudios experimentales que lo confirmaron.

2.6 VPH en el desarrollo de CaCU y lesiones precursoras

La relación de la infección por VPH con el desarrollo de cáncer cervical y sus lesiones precursoras está bien establecida y apoyada con evidencia que vino principalmente de estudios moleculares y epidemiológicos rigurosos que demuestran la presencia de VPH en el 99.7% de los tejidos de CaCU. Así como también, la evidencia indica claramente que ciertos tipos de VPH son la principal causa de cáncer cervical invasor y neoplasia intraepitelial de cérvix (NIC) (12).

Los VPH son virus pequeños de ADN de aproximadamente 55nm de diámetro de forma icosaédrica y contienen un genoma circular de doble cadena de aproximadamente 8000 pb. Más de 200 tipos de VPH han sido identificados, de los cuales alrededor de unos 40 tipos infectan el tracto anogenital (13).

El VPH se clasificó de acuerdo a su asociación con lesiones malignas en el cérvix, en virus de alto y de bajo riesgo. Así, los VPH de alto riesgo se encuentran en lesiones precursoras y CaCU y los VPH de bajo riesgo son los que infectan el cérvix, pero no parecen estar asociados con potencial maligno en el cérvix. Así, los VPHs de bajo riesgo pueden causar lesiones benignas como condiloma acuminado.

En 1995 la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) clasificó a los VPH 16 y 18 como carcinogénicos en seres humanos, los tipos 31 y 33 como probables carcinogénicos y otros tipos virales como posibles carcinogénicos (42). Esta clasificación fue hecha en base a la evidencia publicada hasta 1994. La investigación posterior ha permitido la clasificación de más tipos de VPH acorde con su potencial oncogénico, principalmente basado en la frecuencia de su asociación con el CaCU. La mejor evidencia vino de la IARC en un estudio reciente donde se clasificaron 15 tipos de VPH como oncogénicos o de alto riesgo, 3 tipos como probables oncogénicos o alto riesgo y 12 tipos fueron clasificados como de bajo riesgo (43) como se muestra en la tabla siguiente:

TABLA 2.2. Clasificación de tipos de papilomavirus humanos asociados con cáncer cervical

VPH ALTO RIESGO 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82

VPH PROBABLES ALTO RIESGO 26, 53 y 66

VPH BAJO RIESGO 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108

Los tipos de VPH restantes son considerados como de riesgo oncogénico indeterminado.

La infección del tracto genital por VPH, es la enfermedad de transmisión sexual más común y tiene una gran variedad de manifestaciones clínicas, subclínicas o latentes. Las manifestaciones clínicas son los condilomas acuminados (CA), verrugas genitales, papilomas venéreos o verrugas venéreas. La infección subclínica por VPH es de gran importancia, ya que al no ser aparentes las lesiones, se facilita el contagio. Estas lesiones se comprueban mediante citología y colposcopia; y por último, la infección latente, sin evidencia clínica ni histológica, sólo es posible detectarla con métodos de determinación del ADN. Se desconoce el tiempo y las condiciones para que una lesión latente evolucione a subclínica o clínica. Son los factores virales y celulares los que contribuyen a determinar el curso de la infección. Los estados de inmunodeficiencia pueden activar una infección latente. Las infecciones asintomáticas por VPH pueden ser detectadas en 5%-40% de las mujeres sanas sexualmente activas y en edad reproductiva (42).

La infección por VPH en su gran mayoría puede ser transitoria con un tiempo promedio de duración de 8.2 meses. De hecho, a pesar del alto porcentaje de infección por el virus de papiloma humano en la población general, sólo del 2% al 3% de las mujeres desarrollan displasia [lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LSIL), neoplasia intraepitelial cervical (NIC I)] (44).

La infección por VPHs de alto riesgo no está limitada al tracto genital ya que aproximadamente el 20% de los cánceres orales contienen ADN de VPH de alto riesgo (45).

La infección del tracto genital por VPH puede inicialmente resultar en lesiones de bajo grado llamadas displasia o NIC I. Estas lesiones exhiben ligeramente alteraciones de diferenciación y muchas de ellas son resueltas por el sistema inmune en menos de un año (46).

El mecanismo por el cual el sistema inmune resuelve las infecciones por VPH no está todavía entendido. Algunas de estas lesiones; sin embargo, no son resueltas por el sistema inmune y pueden persistir durante periodos largos. Es por tanto, la persistencia de la infección por VPHs de alto riesgo, el factor de riesgo más grande para el desarrollo de lesiones y cáncer (47).

El VPH es un factor necesario para la transformación maligna del epitelio cervical, pero no suficiente, ya que se requieren ciertos cofactores para que un porcentaje de infecciones persistentes por VPH logre en algún momento progresar y dar lugar al cáncer.

En relación al virus mismo, el tipo de VPH, la carga viral presente y la infección por múltiples tipos de VPH se han identificado como factores de riesgo importantes (47).

Los factores asociados al riesgo de displasia relacionados al huésped son la edad, dieta, multiparidad, tabaquismo, anticonceptivos, inmunosupresión, factores del huésped como los tipos de antígenos de histocompatibilidad y otras enfermedades de transmisión sexual (10). La inmunosupresión es el factor de riesgo más fuertemente asociado al riesgo de NIC y cáncer cervical (48). La primera asociación entre inmunosupresión y progresión de lesiones por VPH fue hecha en mujeres con inmunosupresión iatrogénica secundaria a trasplante renal (49).

Mujeres que están infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) están también en un alto riesgo de desarrollar lesiones y cáncer (50,51).

3. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

3.1 Epidemiología

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el SIDA se ha constituido desde hace más de dos décadas en la principal causa de inmunosupresión adquirida. Descrito por primera vez en 1981, es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo. Para finales del año 2004, el programa de Naciones Unidas en VIH/SIDA (ONUSIDA) calculó que existían 40 millones de personas infectadas con VIH-1 en todo el mundo (52). En lo que respecta a América Latina y el Caribe un estimado de 1.7 millones y 440 000 de adultos y niños vivían con VIH/SIDA respectivamente, a finales de 2004 (52).

Desde el inicio de la epidemia hasta el 01 de noviembre del año 2003, en México se han registrado de manera acumulada 71 526 casos de SIDA. Se calcula; sin embargo, que existen entre 116 y 177 mil personas infectadas por el VIH con una estimación media de 150 000 en el grupo de 15-49 años (53).

La transmisión del VIH puede ocurrir a través de contacto con fluidos corporales infectados. Actualmente se asume que los fluidos corporales como sangre, semen, secreciones vaginales y leche materna son más efectivos en transmitir el virus que los fluidos deficientes en células como saliva, orina y lágrimas. La transmisión puede ocurrir a través del contacto con mucosa o piel abierta durante la relación sexual (homosexual y heterosexual), pero también puede ocurrir vía exposición intravenosa como compartir agujas infectadas por el uso de drogas o por exposición laboral en el área de salud. La transmisión vertical de una madre infectada a su hijo es un problema especial. La transmisión puede ocurrir en el útero, intraparto o posparto durante la lactancia (Revisado en 54).

3.2 Características generales del VIH

El VIH es el agente causal del SIDA. El VIH es miembro de la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus* los cuales se caracterizan por poseer una única enzima que permite copiar su ARN en una doble cadena de ADN.

Las tres regiones codificadoras principales del VIH son el core (gag), polimerasa (pol) y envoltura (env) además de 6 proteínas accesorias (tat, rev, vif, nef, vpr y vpu)

El VIH es un virus que consta de 2 cadenas idénticas, no complementarias de ARN en una nucleocápside o core proteínico. (Figura 3.1) La nucleocápside también empaqueta enzimas claves para la replicación incluyendo la transcriptasa reversa, integrasa y proteasa. El core proteínico del VIH esta contenido a su vez dentro de una bicapa lipídica, porción de la membrana celular infectada tomada durante la gemación viral.

La envoltura viral contiene estructuras específicas que son clave en la infectividad. La glicoproteína gp120 fue reconocida como la estructura principal que interactúa con la proteína CD4 en la superficie de las células susceptibles a infección. gp120 está unida a la envoltura del VIH por una segunda glicoproteína gp41, que se encuentra anclada en la bicapa lipídica.

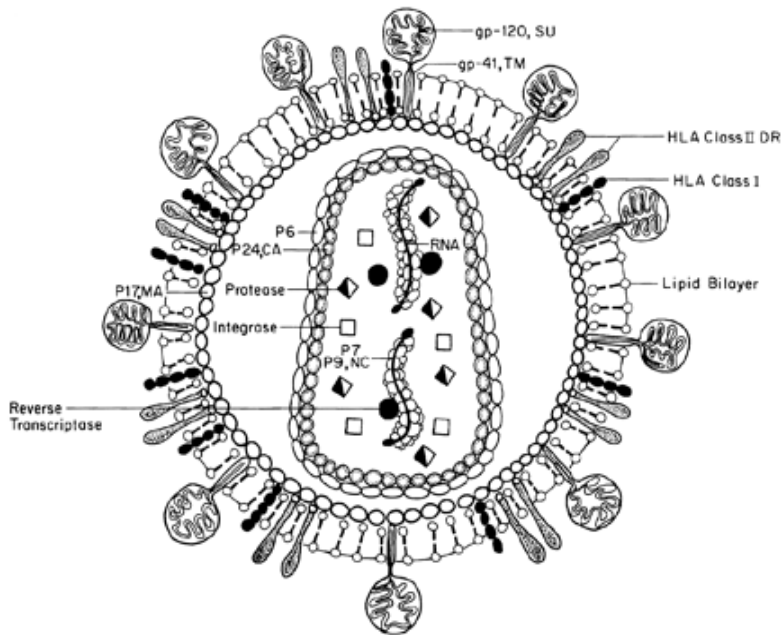


Figura 3.1. Estructura del VIH-1. El virión maduro mide aproximadamente 1,000 Å de diámetro. El genoma de VIH-1 consiste de dos cadenas idénticas, no complementarias de ARN cada una de 9.2 kb, empaçadas en un core proteínico compuesto de la proteína p24, rodeado por p6, que regula la liberación del virus de la célula. Este core está rodeado a la vez por p17 y todo el virión está encapsulado por una bicapa lipídica derivada de la membrana de la célula huésped. Las enzimas virales, RT, integrasa y proteasa están con el ARN en el core. La proteína de superficie (SU) y de transmembrana (TM); gp120 y gp41, respectivamente, forman complejos no covalentes. Además; incorporadas a la envoltura, se encuentran varias proteínas celulares incluyendo HLA clase I y moléculas II DR. Imagen tomada de referencia 54

Como la infección requiere interacciones entre el virus y la célula blanco, las estructuras presentes en las membranas virales y celulares están implicadas. Estas incluyen el antígeno CD4 y receptores de quimiocinas particularmente CCR5 y CXCR4 (Revisado en 55).

Se pensaba que la unión del VIH a las células blanco se debía a la interacción de la glicoproteína gp120 del virus con la molécula CD4 presente en las membranas celulares de los linfocitos T ayudadores (Th), monocitos y macrófagos. Sin embargo, la interacción CD4/gp120 es necesaria pero no suficiente para la infección (56). Esta interacción trae consigo cambios conformacionales en CD4 y gp120 y el reclutamiento de correceptores que pertenecen a la familia de receptores de quimiocinas principalmente CCR5 y CXCR4 (57). Una segunda interacción toma lugar entre gp120 y uno de estos correceptores. Esto trae de nuevo, cambios conformacionales en las glicoproteínas de envoltura virales que conducen a la disociación entre gp120 y gp41 y un cambio en la conformación en ésta última (Revisado en 58).

La entrada de los viriones a la célula se lleva a cabo por la inserción de gp41 en la membrana celular conduciendo a la fusión de las membranas viral y celular y la liberación del core en el citoplasma (59).

La enzima transcriptasa reversa (RT) es liberada junto con el ARN viral. La enzima dirige así la síntesis de una cadena de ADN complementaria a la cadena de ARN viral. Después la RT dirige la síntesis de una segunda cadena de ADN complementaria a la cadena inicial de ADN recién sintetizada (54).

La enzima tiene un alto porcentaje de error a través de la sustitución de bases incorrectas provocando así una de las causas de la alta tasa de mutación del VIH.

La cadena de ADN viral sintetizada a partir del ARN es transportada al núcleo e integrada en el ADN celular por la acción de la integrasa, enzima que es transportada a la célula junto con el ARN y la RT. La integrasa se une a los extremos de la nueva cadena de ADN viral. En el núcleo rompe el ADN celular y transfiere el ADN viral al genoma celular. La integrasa entonces repara las roturas hechas por ésta dejando el ADN proviral insertado en el genoma celular (55). El ADN proviral ahora integrado se encuentra generalmente en estado quiescente y se replica coordinadamente con el ADN celular. Cuando la célula infectada es activada o estimulada, el provirus integrado es activado causando la producción de nuevos viriones.

3.3 Curso de la enfermedad

Aunque el curso de la infección con VIH-1 varía de paciente en paciente puede; sin embargo, generarse un cuadro clínico. (Figura 3.2)

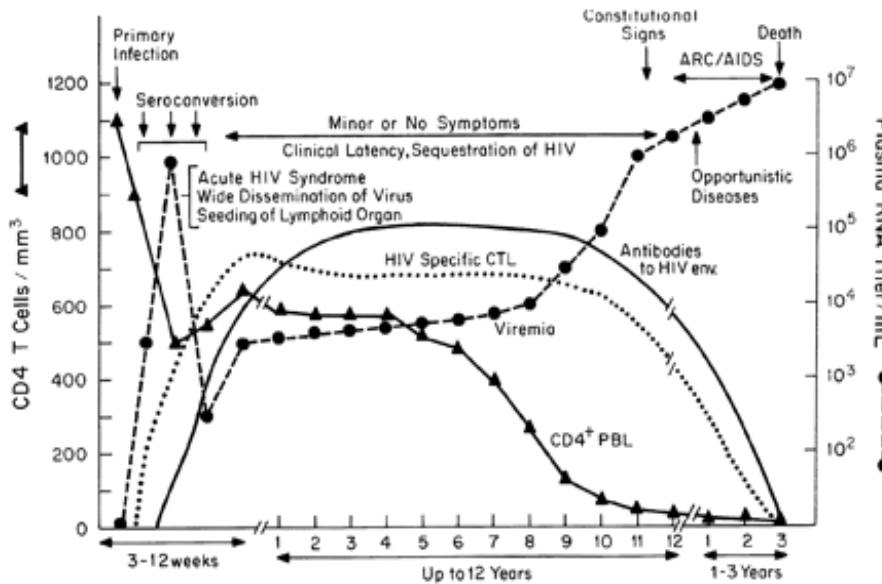


Figura 3.2. Historia natural de la infección por VIH-1. Las primeras semanas después de la infección están caracterizadas por una enfermedad parecida a la gripe (“flu-like illness”). En esta etapa ocurre la seroconversión y hay una alta viremia. Esto es seguido por la diseminación del virus a los órganos linfoides. La infección primaria es seguida por el desarrollo de la respuesta inmune humoral y celular al virus y después un largo periodo asintomático de latencia, seguido por la caída de linfocitos T CD4 en sangre periférica y la aparición de la fase sintomática caracterizada por infecciones oportunistas y otras condiciones que definen el SIDA. Imagen tomada de referencia 54.

Del 50% al 70% de los pacientes desarrollan una mononucleosis aguda dentro de las primeras 3-6 semanas después de la infección (60) caracterizadas por altos niveles de viremia y una disminución importante de células T CD4+ en sangre periférica. Es en esta etapa donde ocurre la seroconversión y se establece el reservorio de células CD4 latentes infectadas (61).

La viremia es seguida por el desarrollo de la respuesta inmune específica contra el VIH; principalmente la activación de células T CD8+, las cuales pueden ser responsables del control de la viremia (62). Mientras estas respuestas pueden reducir significativamente la carga viral en sangre periférica, generalmente son incapaces de resolver completamente la infección. Durante esta etapa, el VIH es diseminado a los nódulos linfáticos. Esto es seguido por una caída importante en la carga viral (100-1000 veces más), un aumento parcial en el número de células CD4 en sangre periférica y después una fase asintomática de infección crónica que puede durar; en promedio, 10 años y que

es caracterizada por la caída gradual de linfocitos T CD4 en sangre periférica y el aumento lento de la viremia. Cuando las células CD4 declinan hasta menos de 200 células/ μ l las enfermedades defensoras de SIDA y otras infecciones oportunistas y/o neoplasia comienzan a aparecer. Esto ocurre con un aumento precipitado en la viremia y una caída en el número de células CD4 (63).

3.4 Tratamiento del SIDA

El tratamiento antiretroviral altamente activo (TARAA) en uso clínico desde 1995, implica la combinación de varios medicamentos antiretrovirales cuya meta es reducir la carga viral de VIH a niveles indetectables (actualmente se usa el ensayo de <50 copias) y como consecuencia restituir la función inmune observándose un incremento en la cuenta de CD4 progresiva.

Los medicamentos antiretrovirales, especialmente cuando se combinan tres o más de ellos han mejorado drásticamente la salud y las vidas de las personas que viven con el VIH/SIDA (PVVS) en el mundo entero (64).

El objetivo de reducir la carga viral se logra con la combinación de tres medicamentos antiretrovirales (a veces llamado coctel) dando como resultado efectos colaterales, toxicidad. La adherencia al coctel es imperativa para limitar el desarrollo de resistencia del virus al TARAA (65). Tanto los múltiples efectos colaterales como las reacciones adversas, pueden conducir a la no adherencia del TARAA colocando al paciente en un alto riesgo de falla del tratamiento. Entre las reacciones adversas se reporta que la náusea, ansiedad, confusión, problemas de visión, anorexia e insomnio, niveles altos de triglicéridos y colesterol fueron asociados significativamente con la no adherencia (66).

Actualmente existen 4 clases de fármacos que colectivamente comprenden el TARAA: 1) inhibidores de proteasa (IP), 2) inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de nucleósidos (NRTIs), 3) inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleósidos (NNRTIs) e 4) inhibidores de la fusión en la membrana celular.

El TARAA implica la combinación de tres medicamentos. Usualmente se combinan 2 NRTIs con un IP pero se puede dar otras combinaciones como 3NRTIs ó NRTI+NNRTI+IP.

Los inhibidores de proteasa compiten con esta enzima, crucial para la maduración viral y replicación. Actúan en las fases tardías del proceso de replicación, bloquean pasos críticos en el ensamblaje de virus dependientes de proteólisis por la acción de la proteasa viral (Revisado en 67).

Los NRTIs inhiben la replicación viral interfiriendo con la transcriptasa reversa. Similarmente los NNRTIs inhiben la replicación viral actuando como un inhibidor no competitivo de la transcriptasa reversa inactivando el sitio activo de la enzima. La reciente introducción del fármaco inhibidor de fusión membranal (Fuzeon) bloquea la captación del virus por el linfocito (67).

El tiempo óptimo para iniciar la terapia en individuos infectados permanece en estado de controversia debido a las diferentes variables; conteo de CD4, carga viral, sintomatología del paciente. Sin embargo se considera que la terapia debería empezarse cuando el paciente presente sintomatología sin importar los niveles de CD4 (68).

El uso de la carga viral como un indicador de cuándo hay que iniciar la terapia es controversial debido a que hay pacientes con alta carga viral y elevados niveles de CD4.

En 1995, el gobierno mexicano elaboró una normativa oficial para la prevención y el control del VIH, que incluye entre otras cosas, protocolos de tratamiento (69).

Las indicaciones para iniciar el tratamiento antiretroviral dependen del estado clínico del paciente. El tratamiento de un paciente adulto debería basarse en la etapa de la enfermedad y en los resultados de pruebas de laboratorio, en particular en los conteos de CD4 y de los linfocitos totales, como también en la determinación de la carga viral. Dichas pruebas deben realizarse al menos cada seis meses. Se recomienda iniciar este tratamiento en el caso de:

- Pacientes con una infección primaria sintomática
- Pacientes con evento definitivo de SIDA (infecciones y neoplasias oportunistas)
- Individuos asintomáticos con un conteo de linfocitos CD4 inferior a $500/\text{mm}^3$ o con una carga viral de $>10,000$ copias/ml en caso de prueba VERSANT® HIV-RNA 3.0 (bDNA, por sus siglas en inglés), o de 20,000 copias según la prueba de reacción en cadena de la polimerasa de la transcriptasa reversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés).

Actualmente, para los pacientes asintomáticos con conteos de CD4 superiores a $350/\text{mm}^3$, no se recomienda iniciar la terapia antiretroviral, dado que el riesgo de desarrollar infecciones oportunistas es relativamente bajo. En cambio, en el caso de los pacientes con un conteo de CD4 inferior a $200/\text{mm}^3$, se recomienda iniciar esa terapia, independientemente de la carga viral del paciente y de la ausencia o no de síntomas pues el riesgo de desarrollar una infección oportunista es significativo (69).

Cuando el conteo de CD4 oscila entre 200 y 350, el nivel de la carga viral en el plasma del paciente resulta importante al momento de decidir si se inicia o no la terapia. Si la carga viral es superior o igual a 55,000 copias/ml, el riesgo de progresión es significativo y, por lo tanto, se recomienda iniciar la terapia.

En aquellos casos en que la carga viral se halla por debajo de las 55,000 copias, el riesgo de progresión es mucho más bajo y la terapia puede ser postergada. Sin embargo, también es necesario tener en cuenta las condiciones particulares del paciente y su propia elección. Si el paciente decide no empezar con la terapia, su conteo de CD4 deberá ser controlado de cerca (esto es, cada 3 o 4 meses).

Con respecto a los pacientes que ya muestran manifestaciones clínicas del VIH, como consecuencia de una infección oportunista o neoplasia, el tratamiento debe iniciarse inmediatamente (69).

La infecciones causadas por VIH producen una variedad de manifestaciones; principalmente, la inmunodeficiencia (asociada principalmente por disminución de linfocitos T-CD4) acompañada de infecciones oportunistas (54). La inmunosupresión causada por la infección por VIH está asociada con una alta susceptibilidad a infecciones por muchos otros agentes microbianos. El riesgo de infección por VPH es particularmente alto en individuos con VIH porque la infección por ambos virus es a través de transmisión sexual y es bien sabido que exponerse a un agente de transmisión sexual coloca al individuo en un alto riesgo de exposición a otro agente de transmisión sexual (70).

La prevalencia de la infección por VPH en mujeres VIH-1 positivas es muy grande debido a los altos factores de riesgo como edad sexual temprana, múltiples parejas, presencia de otra enfermedad de transmisión sexual.

4. COINFECCION ENTRE VIH Y VPH

4.1 Efectos del VIH en la historia natural de las infecciones por VPH

La amplia evidencia que se ha acumulado en las últimas dos décadas ha conducido a la aceptación de que la infección con ciertos tipos de VPH han sido identificados como una causa de NIC y de CaCU y posiblemente de otras neoplasias del tracto genital en las mujeres (71). Tanto la prevalencia de la infección por VPH y el riesgo de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) se incrementan en mujeres que están infectadas con el VIH (51). Varios estudios que involucran a mujeres VIH positivas han mostrado una fuerte relación entre coinfección con VIH, VPH y neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (72, 73, 74). La infección por VIH daña la respuesta inmune incrementando así el riesgo de infección por VPH. La prevalencia de VPH en mujeres VIH positivas están alrededor de un rango de 40%-95% mientras que el rango equivalente en mujeres VIH negativas es de 23%-55%. (72). Así mismo, la prevalencia de NIC se estima en un rango de 10%-36% en mujeres VIH positivas y de 1%-12% en mujeres VIH negativas (75, 76).

Las mujeres que son positivas al virus de la inmunodeficiencia humana tienen más altos grados de NIC que mujeres VIH negativas. En un estudio se reportó que el 7% de aproximadamente 400 mujeres VIH positivas tuvieron altos grados de NIC, comparado con solamente el 1% de las 307 mujeres VIH negativas usadas como control (73). En otro estudio el NIC fue detectado en el 42% de las 273 mujeres VIH positivas comparadas con el 8% de la 161 VIH negativas, la mitad de los casos encontrados en el grupo VIH positivo fueron lesiones de alto grado (74).

Gracias a la frecuencia de estos datos en 1993, 16 794 casos de mujeres con SIDA fueron reportados al Centro de Control de Enfermedades (CDC) y, el CaCU fue el tipo de cáncer más común diagnosticado en el grupo (detectado en 217 [1.3%]). Como resultado el CaCU fue designado por la CDC como un evento definitorio de SIDA y el NIC como una enfermedad relacionada.

La historia de la infección por VPH en pacientes VIH positivos es aún incierta. En individuos inmunocompetentes la mayoría de las infecciones por VPH son limitadas ya que solamente del 2% al 3% de las pacientes desarrollan displasia, a pesar de la gran prevalencia de infección por VPH en la población en general. Los grandes determinantes de la progresión de la enfermedad son el tipo de VPH, la carga viral y la persistencia de la infección (Revisado en 50).

Estudios usando la reacción de PCR para la detección de VPH han mostrado que la incidencia de la infección por VPH llega a ser del 95% en mujeres VIH positivas comparado con el 22% de mujeres VIH negativas. Estas infecciones son persistentes y a menudo involucran infección múltiple por VPH (77, 78).

Seria importante saber si hay alguna alteración en la asociación entre tipos específicos de VPH y el grado de NIC como se ve en la población en general.

Aunque se ha mostrado una asociación similar entre lesiones de alto grado en mujeres VIH+ y tipos de VPH oncogénicos, también existe una alta incidencia de VPHs de alto riesgo en lesiones de bajo grado (NIC I) en mujeres VIH+ (79).

Se ha documentado lesiones de alto grado asociadas con tipos de VPH tanto de alto como de bajo riesgo conduciendo a la especulación de que el VIH puede incrementar la oncogenicidad de los tipos de alto riesgo así como la activación de los tipos de bajo riesgo (80).

En un estudio donde se investigó el impacto de la infección por VIH en la prevalencia, incidencia y progresión de lesiones intraepiteliales, se encontró que el VIH se asoció con una alta prevalencia, persistencia y progresión de NIC (81).

Varios estudios han examinado el papel de la infección por VIH en la persistencia de la infección por VPH. Estas infecciones son persistentes y a menudo involucran múltiples genotipos de VPH (82, 83, 84).

En un estudio donde examinaron el papel de la infección de VIH en la persistencia de VPH se encontró que las mujeres VIH positivas estaban más predispuestas que las mujeres VIH negativas a adquirir nuevas infecciones con VPH oncogénicos y que era menos probable que pudieran resolver estas infecciones (84).

Ahdied y cols en un estudio de casos y controles de 709 mujeres VIH positivas y 341 VIH negativas reportó una prevalencia de 78% de VPH y 27% respectivamente; en este estudio, 19% de las mujeres VIH positivas mostraron evidencia citológica de displasia comparada con solo el 5% de mujeres VIH negativas. Sus resultados concluyen en que la infección por VIH y la consecuente inmunosupresión están asociadas con una alta prevalencia de VPH, un alto riesgo incidente de infección por VPH y una alta persistencia de VPH tipo-específico (85).

Sun en un estudio realizado de 1990-1996 (79), reportó una prevalencia de VPH del 56% en mujeres VIH positivas, comparada con el 31% en mujeres VIH negativas, 20% de las mujeres infectadas y solo 5% de las no infectadas desarrollaron evidencia histológica de displasia cervical, durante el periodo de estudio. También se reportó que las mujeres VIH positivas presentan infecciones persistentes por VPH que las mujeres VIH negativas (24% vs. 4%) respectivamente. Definiendo como infección persistente a la detección del mismo tipo de VPH en las dos o más examinaciones durante un periodo de 3 a 12 meses y que el grado de inmunosupresión (midiendo conteo de células CD4) estaba asociado con la alta persistencia de la infección.

Palefsky en un estudio realizado de 1994-1999 encontró que el 73% de las mujeres VIH positivas tenían citologías anormales versus 42% en las VIH negativas; igualmente la prevalencia del VPH fue de 63% versus 30% respectivamente, el factor de riesgo más fuertemente asociado, fue una cuenta de CD4 < 200 seguido por una carga viral de VIH > de 20,000 (86). Estos estudios muestran que las mujeres VIH positivas, tienen un mayor riesgo de coinfección con VPH y el factor de riesgo más fuertemente asociado fue el grado de inmunosupresión.

En México se han reportado resultados similares (87). En 1997 Volkow y cols en realizaron un estudio en el Instituto Nacional de Cancerología de casos y controles de 85 mujeres VIH positivas y 2 grupos control: Grupo A, 44 mujeres parejas de hombres VIH+ y grupo B, 55 mujeres sexo servidoras.

La prevalencia de VPH fue de 69% (55% VPH alto riesgo) detectada por PCR en mujeres VIH+ comparada con el 29% en los grupos control. No encontraron asociación con la cuenta de células CD4 debido a que la mayoría se encontraba severamente inmunosuprimidas. Ninguna paciente se encontraba recibiendo tratamiento antiretroviral altamente activo (TARAA).

Se determinó el tipo viral en el 95% de los casos y en el 77% en los controles. En las mujeres VIH+, 48% fueron alto riesgo. No hubo evidencia de infección múltiple.

4.2 Impacto del tratamiento antiretroviral altamente activo (TARAA) sobre la infección por VPH y NIC

Como se ha mencionado antes, el TARAA implica la combinación de varios medicamentos antiretrovirales cuya meta es reducir la carga viral del VIH a niveles indetectables y como consecuencia restituir la función inmune observándose un incremento en la cuenta de CD4 progresiva. El impacto de la reconstitución inmune, secundaria al uso de TARAA, en la evolución de la infección por VPH y NIC es controversial.

Heard en un estudio de seguimiento de 168 mujeres positivas para VIH con evidencia histológica de NIC y con seguimiento promedio de 18 meses, encontró que las mujeres que recibieron TARAA presentaron una tasa de regresión en las lesiones del doble que las pacientes sin TARAA (88). Minkoff encontró una tasa de regresión del 40% en 741 mujeres VIH+ con NIC y con un seguimiento de 12-60 meses (89). Estos estudios sugieren que la introducción de TARAA puede cambiar la historia natural de la infección cervical por VPH y NIC; sin embargo, Lillo reportó tasas de progresión similares tratadas con TARAA y no tratadas (90).

En un estudio, el uso de TARAA fue asociado con el 35% de regresión de la lesión en mujeres VIH+ con NIC a pesar de tener infección persistente (91). Sin embargo, el grupo de estudio fue sólo de 49 mujeres con un seguimiento corto de aproximadamente 5 meses. No obstante, las mujeres que mostraron signos de regresión tuvieron altos niveles de CD4 en contraste con las que no presentaron regresión cuyos niveles de CD4 fueron bajos.

5. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACION DEL PROBLEMA

La relación entre la infección cervical persistente por VPH de alto riesgo, NIC y cáncer cervical invasor esta bien establecida (44). Las mujeres infectadas con VIH-1 tienen una mayor prevalencia de VPH y de VPH de alto riesgo así como de la gravedad de las lesiones cervicales asociadas, lo cual las coloca en un riesgo incrementado de desarrollar CaCU (51). Es probable que la restitución inmune asociada al uso de TARAA incremente las tasas de regresión y disminuya la progresión de NIC y con ello el riesgo de transformación maligna se reduce. Sin embargo, el impacto de la reconstitución secundaria al uso de TARAA en la evolución de la infección por VPH y NIC es controversial.

En un estudio realizado en el Instituto Nacional de Cancerología (87) se encontró una alta prevalencia de coinfección por VPH de alto riesgo en mujeres VIH+ antes del uso de TARAA por lo que existe el interés por conocer la prevalencia de infección por VPH de alto riesgo y NIC en pacientes con TARAA o sin tratamiento por no requerirlo.

Como técnicas complementarias a la citología para el diagnóstico de CaCU, se tienen las técnicas de detección del VPH que han surgido con el advenimiento de la biología molecular. En el estudio realizado en el INCan (87) la prevalencia de VPH fue detectada por el método de PCR, por lo que es importante en el presente estudio detectar la prevalencia de VPH no sólo por el método de PCR, sino por el método de Captura de Híbridos; recién aprobada por la FDA, que llega a detectar incluso 1 pg de ADN de VPH/ml y que es considerada como la mejor prueba normalizada de detección del VPH (Revisado en 3). En lo que al método de PCR se refiere, éste puede llegar a lograr una sensibilidad superior a la de la prueba de captura de híbridos. Sin embargo, en algunos casos las variaciones entre los laboratorios son importantes.

5.1 HIPOTESIS

La elevación de los niveles de CD4 a consecuencia de TARAA disminuye la prevalencia de infección por VPH y NIC.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia de infección y lesiones cervicales por VPH en mujeres infectadas con (VIH-1/SIDA) con tratamiento antiretroviral altamente activo (TARAA) o sin tratamiento por no requerirlo.

6.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a) Determinar prevalencia de infección por VPH en mujeres VIH-1(+) que se encuentren con TARAA o sin tratamiento por no requerirlo.
- b) Determinar la prevalencia de NIC en mujeres VIH-1 (+) que se encuentren con TARAA o sin tratamiento por no requerirlo.
- c) Determinar VPH de alto riesgo y su correlación con la cuenta de células CD4.
- d) Determinar neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y su correlación con la cuenta de células de CD4.
- e) Determinar infección múltiple por VPH en mujeres VIH-1 positivas que se encuentren con TARAA o sin tratamiento por no requerirlo.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Universo de trabajo

El periodo de estudio comprendió de agosto de 2002 a septiembre de 2003. Se realizó un reclutamiento activo de pacientes VIH (+), que estuviesen recibiendo TARAA por un periodo igual o mayor a 6 meses o sin tratamiento por no requerirlo, a través de cartas de invitación dirigidas a los médicos de las clínicas de atención especializada VIH/SIDA en la zona metropolitana de la ciudad de México. (Anexo I)

Las pacientes que se encontraban recibiendo TARAA es porque cumplían con cualquiera de las recomendaciones formuladas en la guía de CENSIDA para el tratamiento de pacientes con VIH/SIDA. Las pacientes que no estaban bajo tratamiento por no requerirlo es porque ninguna presentaba evento definitivo de SIDA y sus conteos de CD4 eran 556 ± 80.8 .

7.2. Criterios de selección

7.2.1. Criterios de inclusión

- a) Pacientes con infección por VIH-1 y con TARAA mayor o igual a 6 meses. (Independiente de la respuesta al tratamiento)
- b) Pacientes VIH-1 (+) sin criterios de inicio de TARAA.
- c) Que aceptaron participar en el estudio y firmaron carta de consentimiento. (Anexo II)

7.2.2. Criterios de exclusión

- a) Historia de cáncer cervical invasor
- b) Antecedentes de histerectomía total

7.3. Procesamiento y presentación de la información

El presente trabajo se hizo en colaboración con la Dra. Amelia Rodríguez Trejo en el Instituto Nacional de Cancerología quien fue la que realizó el trabajo directo con las pacientes. Les aplicó un cuestionario a través de un interrogatorio estandarizado en el INCan para investigar sobre factores de riesgo, antecedentes de enfermedad de transmisión sexual, historia ginecológica, obstétrica, historia de tratamientos antiretrovirales utilizados y de evento definitivo de SIDA. (Anexo III)

Les realizó exploración física completa, incluyendo examen ginecológico, con toma de muestra de citología cervicovaginal papanicolau, y dos muestras endocervicales con cytobrush para el análisis de ADN viral por PCR y Captura de Híbridos para VPH de Alto riesgo y Bajo riesgo. Colposcopia sistemática siguiendo los criterios de Coplesson y en caso de lesión colposcópica sospechosa (grado 2, 3), les realizó biopsia dirigida. A todas las pacientes con lesión intraepitelial de alto grado les realizó cono cervical con asa diatérmica.

7.4 Análisis de muestras

7.4.1. Análisis por Captura de Híbridos

La captura de híbridos es un ensayo comercial basado en la hibridación de ADN blanco con ARN de prueba y en su posterior detección quimioluminiscente y se basa en 5 pasos simples: (Figura 7.1)

1. Liberación y desnaturalización de ácido nucleico de especímenes clínicos vaginales o cervicales.
2. Hibridación del ADN blanco con ARN de prueba para crear híbridos ARN-ADN.
3. Captura de los híbridos ARN-ADN en una fase sólida por un anticuerpo específico para los híbridos.
4. Marcado de los híbridos capturados con múltiples conjugados de anticuerpos.
5. Un sustrato quimioluminiscente produce entonces luz que es emitida en un luminómetro. La cantidad de luz generada es proporcional a la cantidad de ADN blanco en el espécimen original.



Figura 7.1. Esquema de la metodología del ensayo de captura de híbridos (HC system II DIGENE; Gaithersburg MD, USA)



Figura 7.2. Foto que muestra el kit colector para la toma de la muestra. Contiene el cepillo y el tubo

El material se obtiene por cepillado del área a estudiar: exo-endocérvix-vagina-vulva con un cytobrush y se coloca en un tubo que contiene un medio de conservación y transporte (Figura 7.2), que retarda el crecimiento bacteriano y preserva la integridad de ADN celular a temperatura ambiente por un máximo de 15 días, tres semanas a -4° o por meses a -20° ; el envío al laboratorio se hace a temperatura ambiente.

La muestra del paciente que potencialmente puede contener el ADN viral, es desnaturalizada y la cadena liberada de ADN es hibridizada en una solución mixta de ARN, que contiene VPHs de bajo riesgo (6, 11, 42, 43 y 44) y VPHs de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68).

Los híbridos de ARN-ADN son capturados en la superficie de una microplaca que contiene anticuerpos inmovilizados que reconocen específicamente a los híbridos de ARN-ADN. Los híbridos capturados reaccionan con un segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina y con un sustrato quimioluminiscente; la luz emitida es leída por una máquina (luminómetro). El resultado numérico y/o cuantitativo no está sujeto al factor subjetivo del examinador; las medidas se expresan en unidades relativas de luz (relative light units-RLU).

7.4.2. Análisis por PCR

La técnica de PCR fue usada para amplificar una región blanco del ADN viral contenido en las muestras. La amplificación requiere la presencia de un par de oligonucleótidos o cebadores complementarios a los extremos de la región blanco en cuestión, tanto el extremo 5' como el 3'. La amplificación se lleva a cabo a través de ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación del primer y elongación del ADN. Posterior a la desnaturalización del ADN (que permite la abertura de la doble hebra), los cebadores de amplificación hibridizan con sus secuencias complementaras de ADN.

La ADN polimerasa usa entonces el ADN como molde para extender cada hebra a partir del cebador. La repetición de estos ciclos provee un acumulado de la secuencia blanco, pudiéndose obtener aproximadamente $1\mu\text{g}$ de ADN.

La muestra endocervical se colocó en un tubo de 2ml con 0.6ml de DNAzol (DNAzol Reagent Invitrogen; Scotland UK). Se incubó la muestra una noche en refrigeración y se procedió a hacer la extracción de ADN. La muestra es sometida a lavados con etanol absoluto (100%) y etanol al 70% y a centrifugaciones con el propósito de precipitar la muestra. Por último se agregó a la muestra 0.2ml de NaOH 8Mm y 0.17ml HEPES 0.1M. La muestra es centrifugada nuevamente y se transfiere el sobrenadante a otro tubo.

Finalmente, la muestra es guardada a -20°. Posteriormente el ADN de la muestra endocervical se purificó por el método de fenol-cloroformo-álcohol iso-amílico. La muestra precipitada (ADN) se suspendió en agua y fue usada para los ensayos de PCR en el Termociclador Perkin-Elmer 2400.

Se utilizaron consensos universales (Invitrogen) MY09/MY11 y GP5+/GP6+.

1. Los cebadores MY09/11 identifican un fragmento de aproximadamente 450 pares de bases de la región L1 de VPH.

MY09: 5' CGTCCMARRGGAWACTGATC 3'

MY11: 5' GCMCAGGGWCATAAYAATGG 3'

M=A+C R=A+G W=A+T Y=C+T

Los cebadores MY detectan los VPH 6,11,16,18,26,31,33,35,39,40,42,45,51 a 59 y al menos otros 25 VPH aún no identificados en la base de datos (NCBI) (92). Estos cebadores amplifican fragmentos de varios tipos diferentes de VPH, es decir, de varias secuencias distintas, por lo tanto se consideran cebadores degenerados.

Una amplificación de 50µl contenía: 2-10 µl ADN se añadían a un tubo que contenía 10 mM Tris-HCL, 4 mM MgCL₂; 200 µM dNTPs; 1PM/ µl de cada cebador (MY09/MY11); 4 U Taq DNA polimerasa. 40 ciclos de amplificación se corren en el Perkin Elmer GeneAmp 2400 (Perkin Elmer Corp) de acuerdo al siguiente protocolo: 1 min. de desnaturalización a 94°, 1 min. de alineamiento a 55° y 1 min. de extensión a 72°. La desnaturalización inicial fue de 10 min. a 94° y la extensión final fue prolongada a 7 min.

2. Los cebadores GP5+/6+ identifica un fragmento de aproximadamente 140 pares de bases de la región L1 de VPH

GP5+: 5' TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC 3'

GP6+: 5' GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC 3'

Los cebadores GP amplifican un amplio espectro de VPHs :6,11,13,16,18,31 a 33,35,39,40,42 a 45,51 a 59,61,63,65 a 66 y otros VPH no identificados en la base de datos. (NCBI) (92). Al igual que los cebadores MY09/11, estos cebadores también son considerados cebadores degenerados.

Una amplificación de 50 µl contenía: 2-10 µl ADN se añadían a un tubo que contenía 10 mM Tris-HCL, 2 mM MgCL₂; 200 µM dNTPs; 1PM/ µl de cada primer (GP5+/GP6+); 2 U Taq DNA polimerasa. 40 ciclos de amplificación se corren en el Perkin Elmer GeneAmp 2400 (Perkin Elmer Corp) de acuerdo al siguiente protocolo: 1 min. de desnaturalización a 95°, 1 min. de alineamiento a 48° y 1 min. de extensión a 72°. La desnaturalización inicial fue de 10 min. a 94° y la extensión final fue prolongada a 7 min.

Para excluir resultados falsos negativos, las muestras fueron probadas con los cebadores de β -globina (PCO4 y GH20)

PCO4: 5' CAACTTCATCCACGTTTCACC 3'

GH20: 5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 3'

Que amplifica un fragmento de 268 pares de bases.

Aquellas muestras que se reportaron negativas a MY09/11 y positivas a β -globina se amplificaron con GP5+/GP6+. Si estas muestras resultaban ser negativas a GP5+/GP6+ se consideraban negativas a VPH.

Las muestras negativas a MY09/11, GP5+/GP6+ y β -globina fueron consideradas inadecuadas para el análisis.

Los productos amplificados de ADN VPH de los 2 oligonucleótidos de consensos universales fueron corridos en un gel de agarosa al 1.5% y teñidos con Bromuro de Etidio.

7.5. Secuenciación

Las muestras positivas a ADN de VPH se procesaron de la siguiente manera. Se les realizó PCR con los cebadores MY 09/11 y GP5+/GP6+. Se purificaron con Kit de columna (QIAGEN, Alemania) para purificar el producto de PCR y quitar exceso de oligonucleótidos, polimerasa y sales. Ya purificadas son sometidas a una reacción de secuencia en la cual se agrega: 2.5 μ l DNA de PCR, 2 μ l cebador MY09 [0.8 pmol], 2 μ l buffer 5x y 1.5 μ l Terminador Big Dye (Applied Biosystems, Foster City, CA). Recolocaron en termociclador de PCR (Perkin Elmer GeneAmp 2400) de acuerdo al siguiente protocolo:

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO	PASO	TEMPERATURA	TIEMPO
1	94°	3:00	4	60°	4:00
2	96°	0:10	5	Ir a paso 2. Rep 24	
3	55°	0:05	6	4°	

Después se precipitaron con etanol. y se resuspendieron en 20 μ l de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, Foster City, CA) se desnaturalizaron por 2 min. a 96° y se ponen en hielo. Se llevaron a equipo (Secuenciador automático ABI 377, PE Biosystems) de 4 capilares del cual se obtiene la secuencia de bases. Se corroboró el tipo de VPH mediante BLAST de MEDLINE.

7.6. Detección de Neoplasia Intraepitelial Cervical.

Diagnosticado por citología cervical de acuerdo al sistema Bethesda 2001 (Normal, inflamatorio, células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS). Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (NIC I), lesión intraepitelial escamosa de alto grado (NIC II, NIC III o carcinoma *in situ* y carcinoma de células escamosas) confirmada histológicamente mediante biopsia dirigida.

Las categorías histológicas fueron reportadas como normal, cervicitis NIC I, NIC II, NIC III o carcinoma *in situ*

8. RESULTADOS

Con el objeto de conocer la prevalencia de VPH y lesiones intraepiteliales en mujeres infectadas con el VIH-1, se realizó un estudio en el que se incluyeron un total de 89 pacientes, 77 pacientes que estaban en TARAA durante un periodo igual o mayor a 6 meses y 12 pacientes sin tratamiento por no requerirlo. Las diferencias en relación a la carga viral VIH, conteo de células CD4 entre los dos grupos se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 8.1. Diferencias entre los dos grupos de estudio

N= 89	CD4/ml	*CARGA VIRAL VIH (MEDIA)	EVEN TO DEFINITARIO DE SIDA
CON TARAA= 77	301±232.85	33 508 copias	34
SIN TARAA= 12	556±80.8	20 000 copias	0

*Los valores de carga viral VIH sólo estuvieron disponibles en 68 (76.4%) pacientes

Como se puede observar, la carga viral de VIH-1 en el grupo de pacientes con tratamiento es mayor que en pacientes que estuvieron sin tratamiento por no requerirlo.

La media de edad del grupo completo fue de 34 años (± 9.3), la vía de adquisición del VIH fue por contacto heterosexual en 92.1%, transfusión 4.5% y desconocido en 3.4%; ninguna paciente tuvo historia de uso de drogas intravenosas. Para el análisis únicamente se incluyó al grupo de mujeres que estuvieran bajo TARAA (N=77).

En relación a la escolaridad, 37(48%) habían completado la educación media superior, 37(48%) se encontraban casadas o en unión libre y 44(57%) se dedicaban al hogar. (tablas 8.2 y 8.3)

Tabla 8.2. Características sociodemográficas de la población

EDAD	VARIABLE	34.1 ± 9.3	N=77	%
ESCOLARIDAD	Primaria incompleta		13	17
	Primaria completa		21	27
	Educación media superior		37	48
	Educación superior		6	8
ESTADO CIVIL	Casada, unión libre		37	48
	Soltera		12	16
	Divorciada		7	9
	Viuda		21	27
OCUPACION	Hogar		44	57
	Empleada		29	38
	Otros		4	5

Tabla 8.3. Características de la población

VARIABLE	N=77	%
IVSA < 18 AÑOS	34	44
≥ 3 compañeros sexuales	28	36
≥ 3 embarazos	35	45
Historia tabaquismo	32	41
Tabaquismo actual	14	18
Historia Prostitución	2	2
Síntomas genitales	41	53
Evento definitorio SIDA	34	44

En relación a su estado inmunológico, 31 pacientes (40%) se encontraban con CD4 <200, 22 (29%) con CD4 entre 201 y 350, 11 (14%) con CD4 entre 351 y 500 y 13 (17%) con CD4 >500 células como se muestra en la tabla siguiente:

Tabla 8.4. Niveles de CD4 en pacientes VIH + bajo tratamiento TARAA

GRUPO	CD4	No. PACIENTES	%
I	<200	31	40
II	> 201-< 350	22	29
III	> 351-< 500	11	14
IV	>501	13	17

Se esperaría que el sistema inmunológico en pacientes con tratamiento TARAA fuera óptimo, ya que la terapia al reducir la carga viral de VIH, podría reconstituir el sistema inmune, siendo reflejado en una posible elevación de las células CD4. Sin embargo, en este grupo de pacientes la gran mayoría (83.2%) se encontraban en estado de inmunosupresión (CD4<500).

Para determinar la prevalencia de NIC, a las pacientes VIH+ que incluye el estudio se les realizó examen citológico completo con toma de citología cervicovaginal Papanicolaou y colposcopia sistemática.

Las citologías cervicales se reportaron como normal 3 (4%), inflamatorio 28 (36%), ASCUS 4 (5%), LIBG 30 (39%) y LIAG 12 (16%). Figura 8.1. Las pacientes con lesión de bajo grado alcanzan cerca del 40% del total de pacientes con TARAA, seguido del 36% que presentan grado inflamatorio. Los hallazgos colposcópicos fueron anormales en 16 pacientes (21%) grado 2 y 5 (6%) grado 3. Figura 8.2.

Fue colposcopia satisfactoria en 65 pacientes. Insatisfactoria en 12 pacientes. Grado 0/sin lesión en 43 pacientes, Grado I en 13 pacientes, Grado II en 16 pacientes y Grado III en 5 pacientes.

En caso de lesión colposcópica sospechosa (grado 2 y 3), se les realizó a 26(34%) de las pacientes biopsia guiada por colposcopia, de ellas 14 tuvieron NIC I y 8 tuvieron NIC II-III. Al igual que se ha documentado en la literatura, las lesiones de alto grado presentan en más del 90% de los casos VPHs de alto riesgo (9); en estas pacientes se detectó genoma viral de VPH de alto riesgo por el método de captura de híbridos en el 100% de las lesiones de alto grado como se muestra en la figura 8.3.

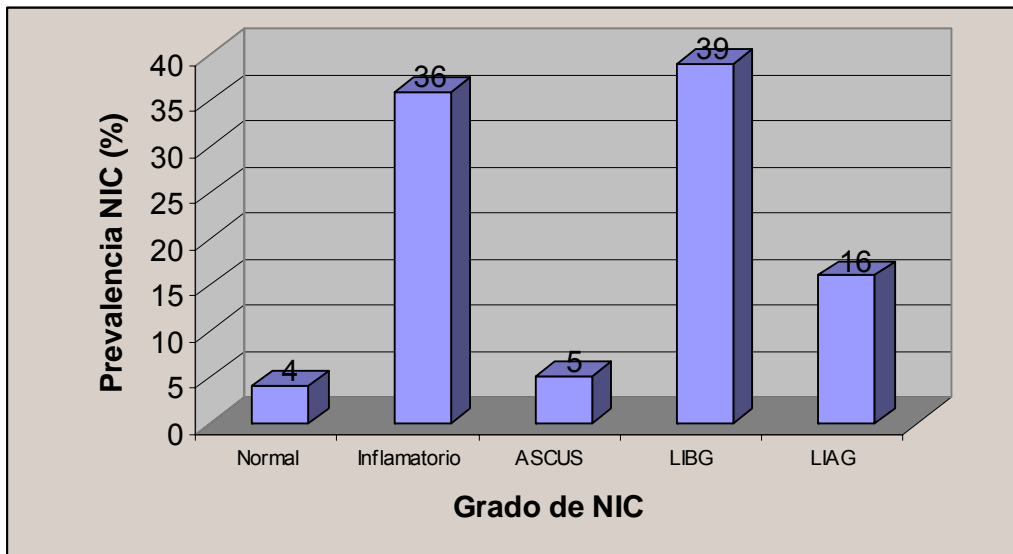


Figura 8.1. Resultado de la citología cervicovaginal Papanicolaou realizadas a las pacientes VIH-1+con terapia antiretroviral (N=77). Grado de NIC diagnosticado de acuerdo al sistema Bethesda 2001 [Normal, inflamatorio, ASCUS= células escamosas atípicas de significado indeterminado, LIBG=lesión intraepitelial de bajo grado (NIC I), LIAG=lesión intraepitelial de alto grado (NIC II, NIC III o carcinoma in situ y carcinoma de células escamosas)]

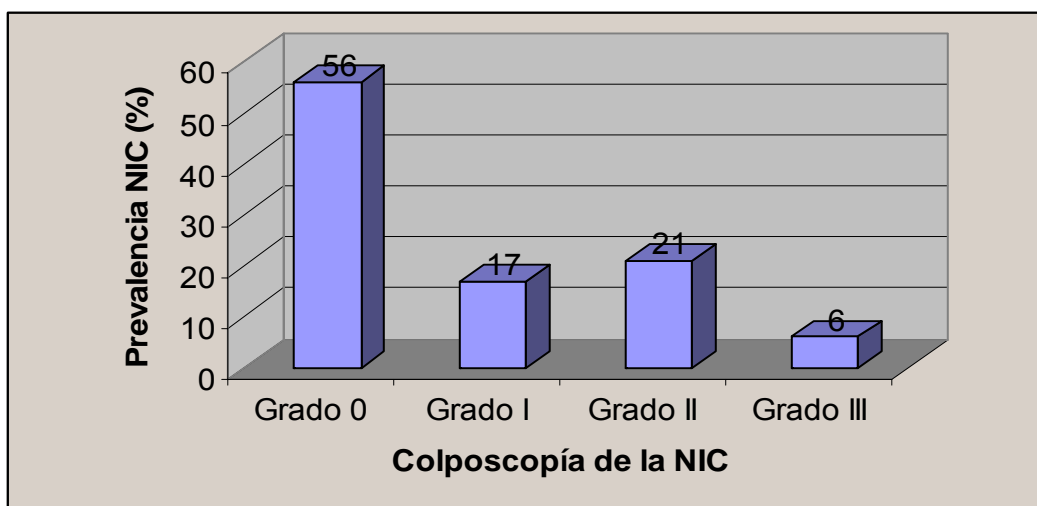


Figura 8.2. Resultado de la colposcopia realizada a las 77 pacientes que incluye el estudio. Criterios de Coplesson. Grado 0= sin lesión, Grados II y III =lesión colposcópica anormal.

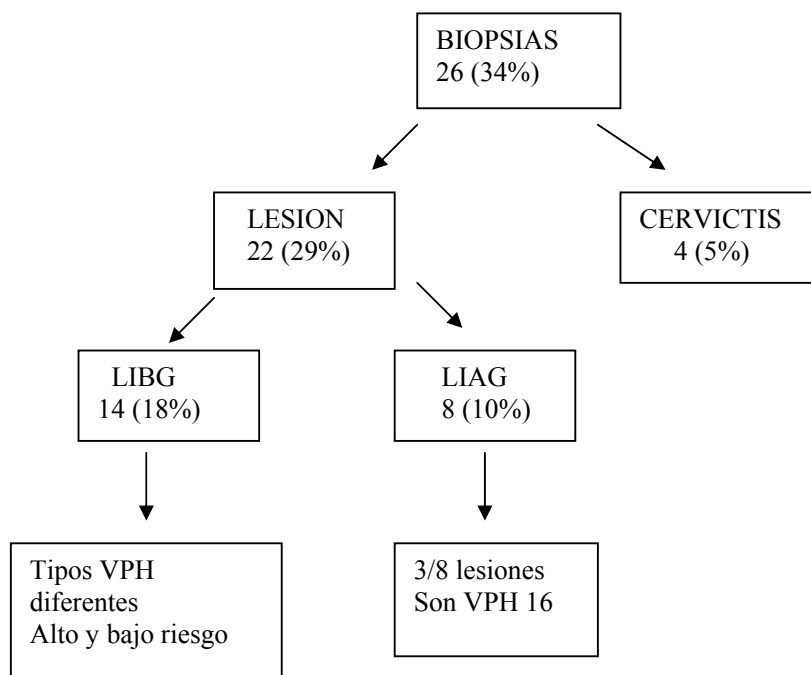


Figura 8.3. Resultado de la biopsia realizada a 26 pacientes con tratamiento antiretroviral. LIBG (lesión intraepitelial de bajo grado o NIC I), LIAG (lesión intraepitelial de alto grado o NIC II-III)

Se analizó la presencia de NIC en mujeres VIH-1+ que se encontraban recibiendo terapia TARAA y su correlación con la cuenta de células CD4. Como se esperaba la prevalencia de NIC es más alta en el grupo de pacientes con mayor grado de inmunosupresión ($CD4 < 200$ células/ml), a pesar de estar recibiendo TARAA que en el grupo con más de 500 CD4/ml donde ninguna paciente presentó lesión. Figura 8.4

Del grupo con $CD4 < 200$ (31), 13 pacientes no presentaron lesión y 18 tuvieron NIC. Del grupo con $CD4$ entre 201 y 350 (22), 19 pacientes no presentaron lesión y 3 tuvieron NIC. De las pacientes con $CD4$ entre 351 y 500 (11), 10 pacientes no presentaron lesión y 1 tuvo NIC y del grupo con $CD4 > 500$ (13), 13 pacientes no presentaron lesión y ninguna presentó NIC.

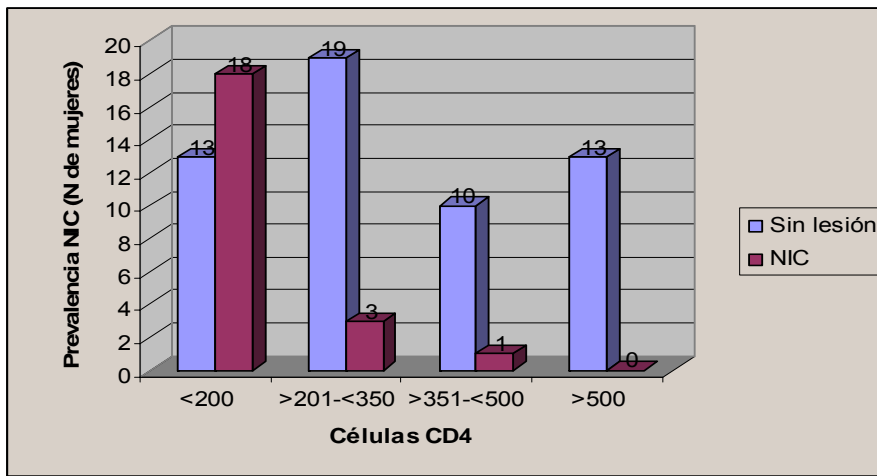


Figura 8.4. Histograma que muestra la correlación entre la prevalencia de NIC y grado de inmunosupresión (células CD4/ml) en mujeres VIH-1+ con TARAA. Las barras azules representan el número de mujeres que no presentaron lesión. Las barras rojas representan el número de mujeres que presentaron neoplasia intraepitelial cervical. La prevalencia de NIC es mayor en pacientes con <200 CD4/ml que en pacientes con >500 CD4/ml donde ninguna presentó lesión. Esta diferencia fue estadísticamente significativa. (Prueba χ^2 , $p < 0.0001$)

La presencia de genoma viral fue detectada por dos métodos:

- Por el método de PCR; el cual identifica, mediante los cebadores de MY, la región LI de VPH de al menos 25 tipos virales tanto de alto como de bajo riesgo y mediante los primers GPs, los cuales identifican también la región L1 de VPH de los tipos 6,11,13,16,18,31 a 33,35,39,40,42 a 45,51 a 59,61,63,65 ,66. (82).
- Por el método de captura de híbridos (HC system II DIGENE; Gaithersburg MD, USA) el cual identifica mediante dos pruebas, la presencia de tipos virales de alto y bajo riesgo y permite determinar la carga viral de ambos tipos virales

La prevalencia de VPH por los métodos de PCR y HC2 para cualquier tipo de VPH fue de 76.6% (59 pacientes). Tabla 8. 5

Por el método de PCR, 6 muestras resultaron inadecuadas para el análisis ya que fueron negativas para ambos cebadores (MY09/11-GP5+/6+) y negativas para β -globina lo que indica falta de ADN o falta de calidad en el ADN. Por lo tanto el número total para el análisis de prevalencia de VPH en mujeres infectadas con VIH-1 es de 71 (N=71).

La prevalencia de ADN viral por PCR fue de 69% (49 pacientes). Figura 8.5

Usando HC2, la prevalencia de ADN viral de alto riesgo fue de 32% (25 pacientes). La Prevalencia de VPH de bajo riesgo fue de 5% (4 pacientes). 24 muestras fueron positivas para ambos tipos virales (alto y bajo riesgo). Lo que demuestra que al menos el 31.2% de las pacientes tienen infecciones con más de un tipo de VPH. Figura 8.6

Tabla 8.5. Resultado del análisis de la prevalencia de VPH en mujeres infectadas con VIH-1 que estaban bajo tratamiento antiretroviral (N=77) por los métodos PCR y Captura de Híbridos. Para el análisis de PCR se utilizó una N=71

TIPO VPH	METODO	No MUESTRAS	%
Cualquier VPH	HC2+PCR	77	59 (76.6%)
Alto riesgo	HC2	77	25 (32%)
Bajo riesgo	HC2	77	4 (5%)
Alto+ Bajo riesgo	HC2	77	24 (31%)
Negativos	HC2	77	24 (31%)
Cualquier VPH	PCR	71	49 (69%)

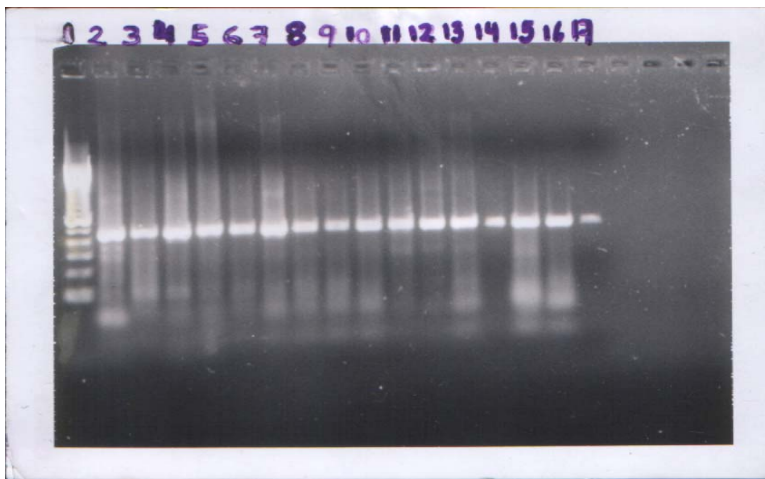


Figura 8.5. Foto de un gel de agarosa al 1.5% y teñido con bromuro de etidio. Muestras positivas a VPH de pacientes VIH+ bajo TARAA de un PCR con los primers MY09/MY11: carril 1-marcador de 100 pb, carril 2-control positivo (SiHa), carril 3-17 muestras positivas a VPH

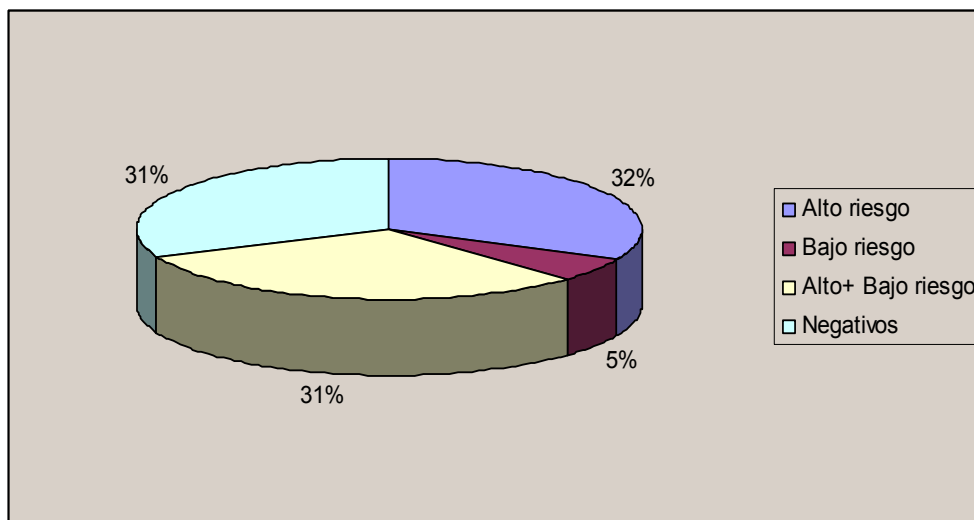


Figura 8.6. Resultado del análisis de ADN viral por el método de HC2 en mujeres VIH-1+ bajo TARAA. Para el análisis de captura se utilizó una N=77. Resultados mostrados en porcentaje

La presencia de ADN de VPH fue identificada por PCR en 49 casos (69%) Tabla 8.5. Se realizó secuenciación de 36 productos de PCR (73%) de diversas pacientes con el objeto de ver que tipo viral predominaba en este grupo de estudio. Las secuencias fueron metidas al programa BLAST del NCBI. De las 36 muestras (100%), 21 (58%) fueron positivas a VPHs de alto riesgo, 4 muestras fueron identificadas como probables de alto riesgo (11%) y 9 fueron positivas a VPHs de bajo riesgo (25%). Las dos muestras resultantes se identificaron como tipos virales no clasificados como de alto o bajo riesgo, como se ve en la figura siguiente:



Figura 8.7. Resultado de la secuenciación realizada a 36 productos de PCR de muestras de pacientes VIH-1+ con terapia antiretroviral.

En este estudio el BLAST determinó como el posible tipo viral más prevalente el 58 clasificado como de alto riesgo reportado en 8 pacientes seguido del tipo 61; considerado según la IARC de bajo riesgo, en 6 pacientes. Tabla 8.6 Es de destacar sin embargo, que a pesar de que el BLAST identificó a las secuencias, la mayoría de éstas presentaban secuencias traslapadas; es decir, infecciones múltiples. Lo que el BLAST determinaba era la secuencia que más predominaba en el cromatograma. Es por esta razón que no se puede afirmar que el VPH 58 es el que predomina en esta población. En el presente estudio la mayoría de las pacientes tenían infección múltiple de acuerdo a los cromatogramas Figura 8.8. De las 36 muestras secuenciadas 28 muestras mostraron cromatogramas con traslapamiento (78%).

Tabla 8.6. Resultados de la secuenciación de los 36 productos de PCR de pacientes VIH-1+ con TARAA.

Tipo (No)			
ALTO RIESGO	INTERMEDIO	BAJO RIESGO	OTRO
58 (8)	66 (4)	61 (6)	84 (1)
31 (5)		81 (2)	62 (1)
16 (4)		44 (1)	
56 (3)			
82 (1)			
Total 21 (58%)	Total 4 (11%)	Total 9 (25%)	Total 2 (5%)

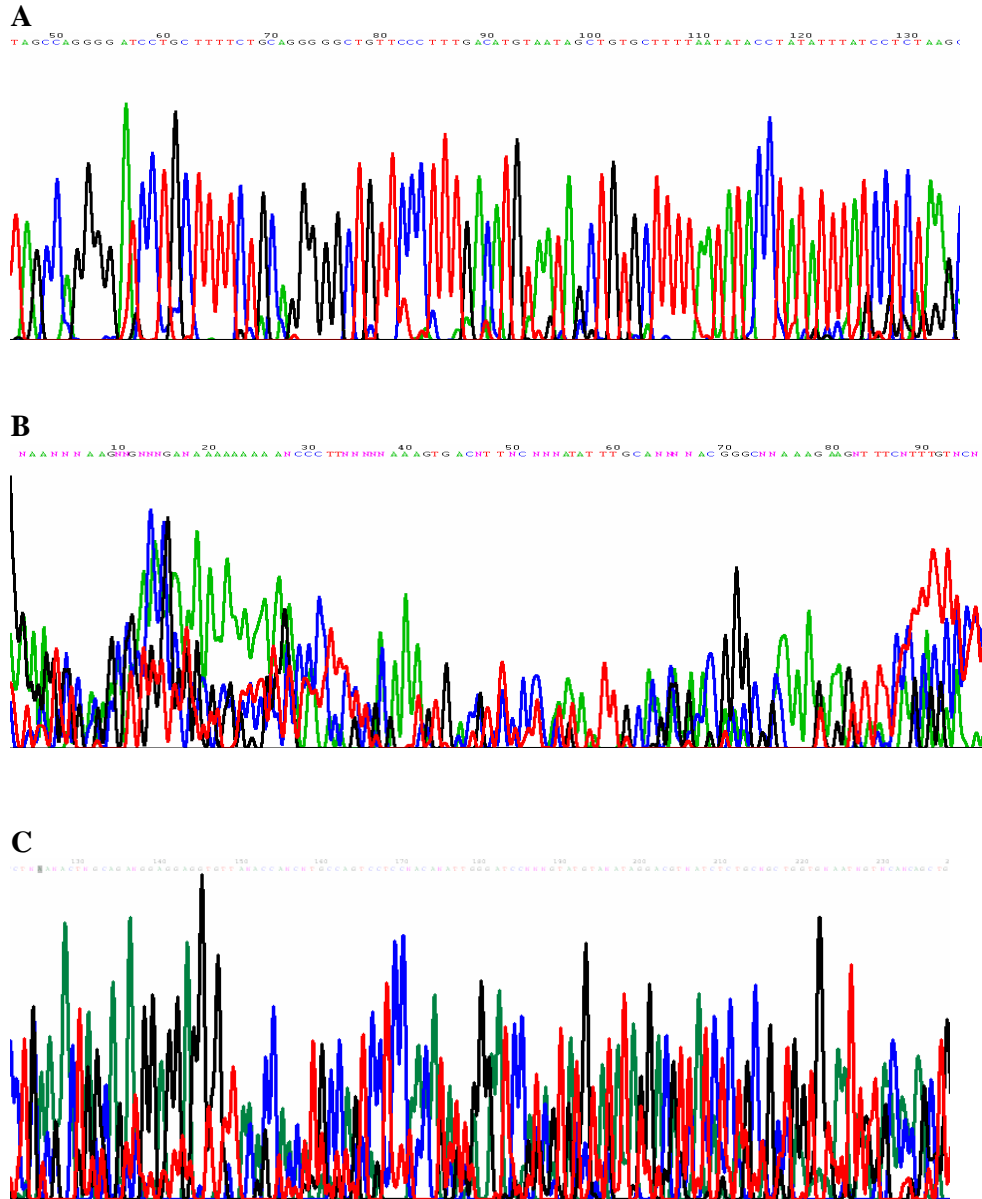


Figura 8.8. Cromatograma de secuencias de VPH de pacientes VIH-1+. A) Fragmento de la secuencia de VPH 58 B) y C) Cromatograma que muestra secuencias traslapadas (infección múltiple).

Se analizó la relación que había entre los niveles de VPH de alto riesgo (VPH-AR) y el estado inmunológico en mujeres VIH+ que se encontraban recibiendo tratamiento antiretroviral. Al igual que la prevalencia de lesiones varía con el grado de inmunosupresión, en este estudio los niveles más altos de VPH-AR se encontraron en aquellas pacientes con el menor grado de inmunosupresión (<200 CD4/ml). Figura 8.9 De las pacientes que tenían menos de 200 CD4/ml (31), 24 tuvieron VPH-alto riesgo, las pacientes que tenían entre 201 y 350 CD4/ml (22), 15 tuvieron VPH-alto riesgo. De las pacientes que tenían entre 351 y 500 CD4/ml (11), 6 tuvieron VPH-alto riesgo y finalmente de las pacientes con mayor grado de células CD4 (>500 CD4/ml) (13), únicamente 4 tuvieron VPH-alto riesgo.

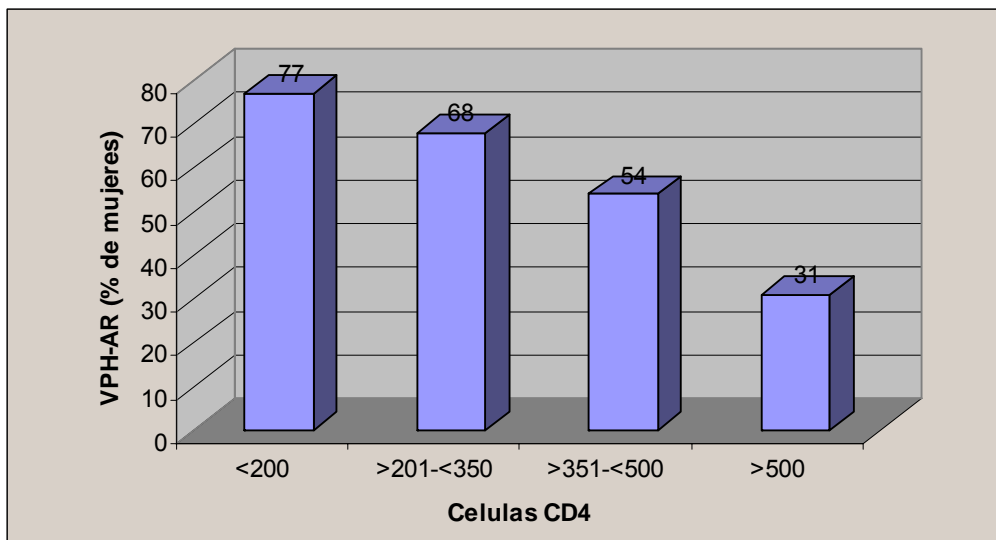


Figura 8.9. Histograma que muestra la correlación entre los niveles de VPH-AR (% de mujeres) y el grado de inmunosupresión (células CD4/ml) en mujeres infectadas con el VIH-1 que se encontraban bajo terapia antiretroviral. Los niveles de VPH-AR fueron más altos en pacientes con <200 CD4/ml que en pacientes con >500 CD4/ml. Esta diferencia fue estadísticamente significativa (prueba χ^2 , $p=0.03$)

Del grupo de pacientes que se encontraban sin tratamiento por no requerirlo (N=12). La media de edad fue de 35 ± 8.64 , la cuenta de células CD4 fue de 556 ± 80.8 , ninguna paciente con antecedente de evento definitorio de SIDA. La prevalencia de VPH por los métodos de PCR y captura de híbridos para cualquier tipo de VPH fue de 75%.

Por el método de PCR una muestra resultó inadecuada para el análisis ya que fue negativa para ambos primers (MY09/11-GP5+/6+) y negativas para β -globina lo que indica falta de ADN o falta de calidad en el ADN. Por lo tanto el numero total para el análisis de prevalencia de VPH en mujeres infectadas con VIH-1 es de 11 (N=11). La prevalencia de ADN viral por el método de PCR fue de 36.4% (4).

Usando captura de híbridos (HC system II DIGENE; Gaithersburg MD, USA) el ADN viral de alto riesgo fue detectado en 6 casos (50%), ADN viral de bajo riesgo fue detectado en 1 caso (8.3%). 2 muestras fueron positivas para ambos tipos virales (alto y bajo riesgo), Lo que demuestra que al menos el 16.6% de las pacientes tenían infecciones con más de un tipo de VPH.

La frecuencia de lesión intraepitelial cervical fue de 41.7% para lesión intraepitelial de bajo grado (LIBG) y 8.3% para lesión intraepitelial de alto grado (LIAG), se corroboró histológicamente por biopsia dirigida por colposcopia NIC I en 1 paciente (8.3%). Las diferencias entre los dos grupos de pacientes se muestran en la tabla 8.7

Tabla 8.7. Comparación de pacientes con TARA A vs. sin TARA A por no requerirlo

VARIABLE	CON TARA A N=77	SIN TARA A N=12
EDAD	34.03 ±1.07	35 ± 8.64
Células CD4	301.3 ± 26.5	556 ± 80.8
Carga viral VIH	33,508.8 copias	20,000 copias
Evento definitorio SIDA	34	0
VPH		
HC2+PCR	59 (76.6%)	9 (75%)
PCR	49 (69%)	4 (36.3%)
HC2-AR	25 (32%)	6 (50%)
HC2-BR	4 (5%)	1 (8.3%)
HC2-AR&BR	24 (31.2%)	2 (16.6%)
CITOLOGIA		
Inflamatorio	35 (36.3%)	6 (50%)
LIBG	30 (38.9%)	5 (41.7%)
LIAG	12 (15.5%)	1 (8.3%)
BIOPSIA		
Cervicitis	4 (5.1%)	1 (8.3%)
NIC	22 (28.5%)	1 (8.3%)
No se realizó	51 (66.2%)	10 (83.3%)

9. DISCUSIÓN

Las características epidemiológicas de la infección por VIH en la mujer mexicana son marcadamente diferentes a las descritas en mujeres VIH+ de otros países, por ejemplo, el antecedente de sexo comercial fue menor del 3% comparado con los altos porcentajes de mujeres con este antecedente en países de África, Sudeste Asiático y aún de países desarrollados (93). Prácticamente ninguna mujer estudiada había usado drogas comparado con el 34% reportado en mujeres norteamericanas con VIH/SIDA en el estudio de Palefsky (86). De hecho, múltiples estudios realizados en Estados Unidos han mostrado un alto porcentaje de mujeres VIH+ que tenían antecedente de uso de drogas (72, 75,94). El antecedente de 3 o más parejas sexuales sólo se reportó en 36.4% de las mujeres estudiadas, y el tabaquismo sólo se encontró en 18.2% comparado con mujeres en países desarrollados (86).

El estudio realizado en el Instituto Nacional de Cancerología por Volkow y cols, (87) tenía como objetivo determinar la prevalencia de VPH y lesiones intraepiteliales escamosas en mujeres infectadas con el VIH-1. El número de mujeres VIH+ que fueron reclutadas en ese estudio fue de 85, casi igual al presente trabajo. En cuanto a las características epidemiológicas de la infección por VIH en ambos grupos de estudio, encontramos una gran similitud. En el estudio realizado por Volkow, la edad media del grupo fue de 33 (rango 17-56). De las mujeres VIH+, 67(78.8%) fueron infectadas por contacto heterosexual, 7(8.2%) fueron infectadas por transfusión sanguínea, 7(8.2%) fueron infectadas por mecanismo desconocido, 3 (3.5%) fueron donadores pagados y 1 (1.2%) adquirió la infección por VIH por exposición accidental. Esta información fue obtenida a través de un cuestionario estandarizado, aplicado a las pacientes y cuyo objetivo era investigar sobre factores de riesgo, antecedentes de enfermedad de transmisión sexual, historia ginecológica, etc.

En relación a su estado inmunológico, el número de CD4 fue estadísticamente bajo en las mujeres VIH+ [152 (rango 48-2108)]. De las 85 mujeres, 26 mujeres (31%) no se encontraban recibiendo tratamiento antiretroviral, 45 (53%) mujeres recibían sólo nucleósidos, 1 paciente tomaba inhibidor de proteasa y 14 (16%) tomaba nucleósidos más un inhibidor de proteasa.

El objetivo del presente trabajo fue conocer la prevalencia de VPH y NIC en mujeres infectadas con el VIH-1. El grupo de estudio fue de 89 mujeres. La media de edad del grupo completo fue de 34 años (\pm 9.3), la vía de adquisición del VIH fue por contacto heterosexual en el 92.1%, transfusión 4.5% y desconocido en el 3.4%. De las 89 pacientes, 77 se encontraban bajo TARAA y 12 pacientes estaban sin tratamiento por no requerirlo.

El TARAA, como su nombre lo indica, es el tratamiento antiretroviral altamente activo, el cual implica la combinación de varias drogas antiretrovirales. El tratamiento con un solo fármaco o la monoterapia contra la infección por VIH no es efectivo por la rápida emergencia de virus resistentes. (54) La combinación de varios fármacos es actualmente la mejor estrategia para el manejo del VIH. Sin embargo, no existe la evidencia suficiente de que la terapia basada en la combinación de varios fármacos pueda completamente eliminar el virus.

En cuánto a cuándo se debe iniciar TARAA, lo primero que se debe considerar es que el tratamiento debe empezarse en todos los pacientes sintomáticos (con algún evento definitorio de SIDA) sin importar los niveles de CD4 (68). Actualmente es recomendado que el tratamiento consista de 3 regímenes de fármacos incluyendo dos diferentes inhibidores de la RT análogos nucleósidos más un inhibidor de proteasa.

El uso de TARAA da la posibilidad de restituir la inmunidad, siempre y cuando se obtenga la meta del tratamiento que es impedir la replicación viral; es decir, bajar la carga viral hasta niveles indetectables (<50 copias). En este estudio no se evaluó la eficacia de TARAA; sin embargo, sólo 26 (33.76%) pacientes tenían carga viral indetectable (<50 copias ARN VIH); a pesar de que todas tenían más de seis meses recibiendo la terapia, lo cual indica falla virológica en un alto porcentaje. Las pacientes fueron reclutadas de seis diferentes instituciones de atención especializada, y ello pone de manifiesto la gran heterogeneidad en la calidad de atención de las pacientes y la falta de parámetros de medición de respuesta a TARAA estandarizados. Estos resultados constituyen un llamado para reforzar los criterios de manejo y mejorar la tasa de respuesta a TARAA en México. De hecho, en nuestro estudio, a pesar de que todas las mujeres se encontraban recibiendo más de un fármaco, la mayoría de las pacientes se encontraba inmunosuprimidas

Este grupo de mujeres VIH+ se muestra con respuesta a TARAA diversas y como resultado diferentes grados de inmunosupresión. El 83.2% de las pacientes se encontraban en estado de inmunosupresión (CD4<500) y de éstas, 40.3% con inmunosupresión severa (CD4<200). Datos de múltiples estudios tanto de mujeres como de hombres VIH positivos han mostrado una relación entre inmunosupresión medida por el nivel bajo de CD4 (<500/ml), y un aumento en la prevalencia de la infección anal y cervical por VPH, con muchos estudios mostrando un mayor riesgo de infección en aquéllos con menos de 200 CD4/ml (79, 86, 95, 96) como fue el caso de este estudio.

En el presente estudio observamos una alta prevalencia de ADN de VPH en mujeres VIH + de 69% por PCR. Esta prevalencia es similar a la encontrada por Palefsky, que fue del 63% por el método de PCR usando los primers MY09/11 en mujeres infectadas con el VIH-1 en Estados Unidos. (86) El factor más fuertemente asociado fue una cuenta de CD4 de <200/ml seguido por una carga viral de >20 000 copias. Es de destacar en nuestro estudio la relación inversa entre los niveles de CD4 y la prevalencia de VPH-AR y NIC. Volkow reportó una prevalencia de infección por VPH del 69% (57 mujeres VIH-1+) por el método de PCR (87). En el presente estudio encontramos también una prevalencia de infección por VPH del 69% por el método de PCR. Sin embargo en el estudio de Volkow no se observó ninguna asociación entre CD4 y el riesgo de infección por VPH.

En mujeres y hombres VIH + existe una relación entre cantidad de ADN de VPH (carga viral) y nivel bajo de CD4 (<500/ml) con un mayor riesgo en aquéllos con menos de 200 CD4/ml. Junto con los niveles altos de VPH existe además, una relación entre niveles bajos de CD4 y un alto número de tipos de VPH en muestras anales y cervicales. (86, 95, 96)

El papel de la inmunosupresión en los tipos específicos de VPH, muestran que los VPH de alto riesgo son más probables de persistir que los tipos de bajo riesgo (79). Así, si las mujeres VIH + son menos capaces de resolver la infección en comparación con las mujeres VIH -, podría explicarse entonces el alto riesgo de NIC en este grupo. Estudios en grupos de mujeres VIH + y VIH -, indican que la prevalencia de VPH 16 en mujeres VIH + comparado con mujeres VIH - es menor, que para otros tipos virales (82, 86). Otros estudios demuestran lo contrario, una alta prevalencia del VPH 16 (97).

Sabemos que el VPH 16 es el tipo viral oncogénico más común en la población en general y que la infección por VPH en su gran mayoría suele ser transitoria con un tiempo de duración de 8.2 meses y que sólo del 2% al 3% de la población desarrollan displasia (44). Podría sugerirse entonces que el VPH 16 es capaz de escapar del control del sistema inmune, es decir continuar su replicación viral conforme el estado de diferenciación de la célula epitelial, aún en individuos inmunocompetentes en comparación con otros tipos virales (Revisado en 98).

En un individuo inmunosuprimido, como es el caso de pacientes VIH + tipos virales que normalmente son resueltos por el sistema inmune, podrían replicarse debido a la falta del control inmune dando como resultado la infección con múltiples tipos. Así, la infección en individuos VIH + sería no sólo por el VPH 16 sino que probablemente habría una infección por otros tipos virales.

De la secuenciación, los probables tipos virales más prevalentes fueron en nuestro estudio, de alto riesgo predominando el tipo 58. No pudo realizarse la secuenciación en todas las muestras; sin embargo, la mayoría de los cromatogramas presentaba traslapamiento indicando infección múltiple. Además de que estos cromatogramas eran de pacientes con el menor nivel de CD4 (<200 CD4/ml). Sería de esperarse que los resultados de la secuenciación mostraran al VPH 16 como el tipo más prevalente, al igual que la población en general. Sin embargo, como mencionamos antes, este grupo de estudio es considerado diferente ya que se encuentran severamente inmunosuprimidos por la coinfección con el VIH-1. La mayoría de los pacientes en el presente estudio tenían infección múltiple. De las 36 muestras secuenciadas 28 mostraron cromatogramas con traslapamiento. Varios estudios han mostrado el papel de la infección por VIH en la infección por múltiples tipos de VPH (79, 82, 83). Palefsky detectó infección múltiple en el 36% de mujeres VIH + y en el 12% en mujeres VIH - (86).

Similarmente Ellerbrock observó infecciones múltiples en el 12% de mujeres VIH+ (75) En el estudio de Volkow, encontraron que el 48% fueron tipos de alto riesgo; predominando el tipo 16, el 13% fueron de riesgo intermedio y 26% fueron bajo riesgo. El 13% pertenecían a diferentes categorías. En este estudio no hubo evidencia de infección múltiple.

El gran número de tipos de VPH en los individuos severamente inmunosuprimidos pudiera ser consistente con la pérdida del control inmune permitiendo la suficiente replicación viral y facilitando la detección de VPH por pruebas como PCR. Los altos niveles de ADN de VPH vistos en pacientes con menos de 200 CD4 también pudiera reflejar el alto número de tipos de VPH (infección múltiple). La falla del sistema inmune para resolver la infección pudiera incrementar la persistencia de infección por VPH.

Pudiera ser también que la replicación de VPH sea más eficiente en individuos inmunodeficientes, lo que resultaría en el desarrollo de infecciones por VPH persistentes. Si la exposición a nuevas infecciones continúa, pudiera resultar en una acumulación de diferentes tipos de VPH y una alta prevalencia de mujeres infectadas con múltiples tipos VPH.

El papel de la inmunosupresión medida por los niveles de CD4, en incrementar el riesgo de infección por VPH y NIC ha sido bien establecido (94). La fuerza de la relación entre la inmunosupresión y la prevalencia de NIC, radica más en el nivel de CD4 que en la carga viral de VIH, implicando que los datos de mujeres VIH + con altos niveles de NIC, reflejan la disfunción del sistema inmune y no el efecto directo del VIH ya que se ha demostrado en otros estudios, que NIC es más fuertemente detectado en mujeres con inmunosupresión iatrogénica secundaria a trasplantes renales (49).

En el presente estudio encontramos que la prevalencia más alta de NIC fue en el grupo de pacientes con mayor grado de inmunosupresión (<200 CD4/ml) y no en el grupo con más de 500 CD4/ml donde ninguna presentó lesión.

La experiencia usando TARAA para controlar la replicación del VIH en individuos dualmente infectados con el VIH y el VPH ha sido instructiva. Varios estudios han examinado el efecto de TARAA en la historia natural de NIC. Los resultados han mostrado tanto efectos benéficos como otros mostrando ningún efecto (88, 89, 90).

Sin embargo, aún en los estudios que muestran un efecto benéfico del TARAA, la mayoría de las mujeres con NIC II o III no muestran regresión después de la aplicación del TARAA aún con niveles altos de CD4 (88). Así que, ni la regresión de las lesiones de alto grado, ni la progresión de éstas a CaCU están asociadas con el estado inmune de las pacientes medido por los niveles de CD4. Probablemente el sistema inmune participe en desarrollar las lesiones cervicales de alto grado, pero una vez que éstas se desarrollen, otros factores como mutaciones genéticas jueguen un rol más directo en la progresión de las lesiones de alto grado a cáncer. Así, la reconstitución inmune; en un nivel particular de la enfermedad, no tendría mucho valor.

En las mutaciones genéticas pudieran estar involucrados los genes E6 y E7 como probables causantes, los cuales inducen inestabilidad cromosómica y ésto conduciría a la acumulación de mutaciones genéticas (33).

Sería posible entonces que muchas lesiones NIC III hayan acumulado suficientes mutaciones genéticas de manera que la reconstitución inmune sea incapaz de detener la progresión de la lesión.

Los resultados de este estudio mostraron que la prevalencia de VPH en mujeres con TARAA y >de 500 CD4 fue del 31%, y ninguna presentó lesión por biopsia comparado con la prevalencia de VPH en mujeres con < 350 células CD4 donde se observó una prevalencia de 73.6% y de NIC de 39.6% corroboradas histológicamente.

En el grupo de mujeres sin tratamiento por no cumplir criterios para su inicio, todas ellas con CD4 > 350, la prevalencia de VPH en mujeres con >500 CD4 fue de 66.6% y NIC de 8.3%. Es de destacar, sin embargo, que la carga viral en este grupo fue significativamente menor con promedio 88.36 URL comparada con la carga viral de pacientes con < 350 CD4 con promedio de 810.22 (1.49-3741.9) y de aquellas con

> 500 CD4 cuyo promedio fue de 99.54 (2.04-225.2) en TARAA. Estos resultados destacan la importancia de la restitución en los niveles de CD4 en la infección por VPH y lesiones cervicales asociadas y sugieren una fuerte asociación como se observó en el análisis tanto para prevalencia de VPH-AR como para NIC con los grados de inmunosupresión.

En resumen, el sistema inmune puede jugar un mejor papel en el control de la replicación del VPH y el desarrollo de las lesiones tempranas como NIC I. En cambio, la progresión de las lesiones de alto grado a cáncer pudiera estar afectada más por mutaciones genéticas celulares.

El porcentaje tan alto de pacientes con replicación viral de VIH a pesar de estar recibiendo TARAA enfatiza la necesidad de mejorar los protocolos del manejo de antiretrovirales en nuestro medio, ya que un alto porcentaje de pacientes con TARAA permanece en estado de inmunosupresión severo.

La valoración de las mujeres VIH positivas debe incluir un examen citológico completo con citología y colposcopia que podría repetirse cada seis meses. Si no se detecta ninguna alteración se podrían hacer controles anuales, aunque, dependiendo de las condiciones inmunológicas del caso y de las posibilidades diagnósticas, es preferible un seguimiento cito-colposcópico semestral.

10. CONCLUSIONES

- La prevalencia de VPH y NIC sigue siendo alta en mujeres VIH+ aún con el uso de TARAA.
- Encontramos una fuerte asociación inversa entre el grado de inmunosupresión y el riesgo de infección por VPH-AR y lesiones cervicales (NIC), lo que enfatiza la necesidad de vigilancia ginecológica regular en pacientes VIH+ para diagnóstico temprano de lesiones premalignas y prevención de cáncer cervical invasor utilizando el abordaje combinado de citología cervical y colposcopia desde la evaluación inicial.
- La mayoría de las mujeres VIH+ tenían tipos virales de alto riesgo y en un gran número albergaban más de un tipo viral.

11. PERSPECTIVAS

Realizar la clonación de las muestras positivas a VPH para la completa seguridad del tipo viral predominante en esta población de pacientes.

12. REFERENCIAS

1. Muñoz N, Bosch FX. Cáncer de cerviz y virus del papiloma humano: evidencia epidemiológica y perspectivas para su prevención. *Salud Pública México* 1997; 39: 388-396
2. Lewis MJ. Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe. Organización Panamericana de la Salud 2004. www.paho.org
3. Castellanos Morales MR. Cáncer cervicouterino y el VPH. Opciones de detección. *Rev Fac Med. UNAM* 2003; 46: 63-66
4. Capítulo 1. Introducción a la anatomía del cuello uterino. <http://screening.iarc.fr/colpo>
5. Registro Histopatológico de Neoplasias en México. 2000
6. Capítulo 2. Introducción a la Neoplasia Intraepitelial Cervical. <http://screening.iarc.fr/colpo>
7. Richard RM. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Obstet Gynecol* 1968; 5: 748-784
8. Serman F. Cáncer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus papiloma humano. Perspectivas en prevención y tratamiento. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2002; 67: 318-323
9. Milde-Langosch K, Riethdorf S and Loning T. Association of human papillomavirus infection with carcinoma of the cervix uteri and its precursor lesions: theoretical and practical implications. *Virchows Arch* 2000; 437: 227-233
10. Franco EL, Schlecht NF and Saslow D. The epidemiology of cervical cancer. *The Cancer J.* 2003; 9: 348-359
11. Vonka V, Kanaka J, Roth Z. Herpes simplex type II and cervical neoplasia. *Adv Cancer Res* 1987; 48: 149-91
12. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-19
13. Zur Hausen. H. Papillomavirus causing cancer: evasion from host cell control in early events in carcinogenesis. *J Nat Cancer Inst* 2000; 92: 690-698
14. Barksdale SK and Baker CC. Differentiation-specific expression from the bovine papillomavirus type 1 P2443 and late promoters. *J Virol* 1993, 67: 5605-5616

15. Baker C and Howley PM. Differential promoter utilization by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues. *EMBO J* 1987; 6: 1027-1035
16. Howley PM and Knipe D. *Fields Virology* 2001; 2: Chapter 66. Page 2233. Fourth edition
17. Chow LT and Broker TR. In vitro experimental systems for HPV: Epithelial raft cultures for investigations of viral reproduction and pathogenesis and for genetic analysis of viral proteins and regulatory sequences. *Clin Dermatol* 1997; 15: 217-227
18. McMillan NA, Payne E, Frazer IH, et al. Expression of the alpha 6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative β cells. *Virology* 1999; 261: 271-279
19. Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell- surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* 1999; 274: 5810-5822
20. Hummel M, Hudson JB and Laimins LA. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J Virol* 1992; 66: 6070-6080
21. Gilbert DM and Cohen SN. Bovine papilloma virus plasmids replicate randomly in mouse fibroblasts throughout S phase of the cell cycle. *Cell* 1987; 50: 59-68
22. Conger KL, Liu JS, Kuo SR, et al. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase alpha/primase. *J Biol Chem* 1999; 274: 2696-2705
23. Cheng S, Schmidt-Grimminger DC, Murant T, et al. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes & Dev* 1995; 9: 2335-2349
24. Fehrman F, Klumpp DJ and Laimins LA. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J Virol* 2003; 77: 2819-2831
25. Longworth MS and Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol & Mol Rev* 2004; 68: 362-372
26. Dvoretzky I, Shober R, Chattopadhyay SK, et al. A quantitative *in vitro* focus assay for bovine papillomavirus. *Virology* 1980; 103: 369-375

27. Barbosa MS, Vass WC, Lowy DR, et al. In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential. *J Virol* 1991; 65: 292-298
28. Pirisi L, Yasumoto S, Feller M, et al. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol* 1987; 61: 1061-1066
29. Schlegel R, Phelps WC, Zhang YL, et al. Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma. *EMBO J* 1988; 7: 3181-3187
30. Cullen AP, Reid R, Campion M, et al. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 1991; 65: 606-612
31. Berumen J, Casas L, Segural E, et al. Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int J Cancer* 1994; 56: 640-645
32. Schmidt MT, Olejnik AK and Gozdzicka-Jozefiak A. The HPV16 E2 transcriptional regulator mode of action depends on the physical state of the viral genome. *Acta Biochim Pol* 2005; 52: 823-832
33. Galloway DA and McDougall JK. The disruption of cell cycle checkpoints by papillomavirus oncoproteins contributes to anogenital neoplasia. *Seminars in Can Biol* 1996; 7: 309-315
34. Southern SA and Herrington CS. Disruption of cell cycle control by human papillomaviruses with special reference to cervical carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2000; 10: 263-274
35. Ko LJ and Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes & Dev* 1996; 10: 1054-1072
36. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, et al. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63: 1129-1136.
37. Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU, et al. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol* 1999; 73: 6209-6219
38. Klingel-Huntz AJ, Foster SA and McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of HPV type 16. *Nature* 1996; 380: 79-82.

39. Chellappan S, Kraus VB, Kroger B, et al. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *PNAS USA* 1992; 89: 4549-4553
40. Gissman L and zur Hausen H. Human papillomaviruses: physical mapping and genetic heterogeneity. *PNAS* 1980; 73: 1310-1314
41. Boshart M, Gissman L, Ikenberg H, et al. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 1984; 3: 1151-1157
42. IARC Working Group. Human papillomavirus. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. IARC, Lyon 1995; 64
43. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose R, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-527
44. Ho G, Bierman R, Beardsley L, et al. Natural History of cervicovaginal papillomavirus infection in young Women. *N Engl J Med.* 1996; 338: 423-428
45. Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, et al. Human papillomavirus and oral cancer: The International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Nat Cancer Inst* 2003; 95: 1772-1783
46. Hopft R, Heim K, Christensen N. Spontaneous regression of CIN and delayed-type hypersensitivity to HPV-16 oncoprotein E7. *Lancet* 2000; 356: 1985-1986
47. Ho GYF, Burk RD, Klein S, et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Nat Cancer Inst.* 1995; 87: 1365-1371.
48. Schiffman MH. Epidemiology of cervical human papillomavirus. In: zur Hausen H, ed. *Human pathogenic papillomavirus*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1994.
49. Halpert R, Fruchter RG, Sedlis A, et al. Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transplant patients. *Obstet Gynecol* 1986; 68: 251-258
50. Clarke B and Chetty R. Postmodern cancer: the role of human immunodeficiency virus in uterine cervical cancer. *Mol Pathol.* 2002; 55: 19-24.
51. Ferenczy A, Coutlée F, Franco E, et al. Human papillomavirus and HIV coinfection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments. *JAMC* 2003; 169: 431-434

52. The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (2004). Global summary of the HIV and AIDS epidemic in 2004. Available: <http://www.unaids.org/en/Resources/epidemiology/epicore.asp>
53. Epidemiología del VIH/SIDA en México en el año 2003. Secretaría de Salud. Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA (CENSIDA). Datos al 01 de noviembre de 2003
54. Schwartz SA and Nair M. Current concepts in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6: 295-305
55. Volberding PA, Baker KR and Levine AM. Human immunodeficiency virus hematology. *Hematology* 2003; : 294-313
56. Levy JA. Infection by Human immunodeficiency virus-CD4 is not enough. *N Engl J Med* 1996; 335: 1528-1530
57. Berger EA, Murphy PM and Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism and disease. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 657-700
58. Nisole S and Saib A. Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology* 2004; 1: 1-20. Available: <http://www.retrovirology.com/content/1/1/9>
59. Gallo SA, Finnegan CM, Viard M, et al. The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1614: 36-50
60. Lyles RH, Muñoz A, Yamashita TE, et al. Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. *J Infect Dis* 2000; 181: 872-880
61. Persaud D, Zhou Y, Siliciano JM, et al. Latency in human immunodeficiency virus type 1 infection: no easy answers. *J Virol* 2003; 77: 1659-1665
62. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, et al. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1994; 68: 6103-6110
63. Pantaleo G, Graziosi C and Fauci AS. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1993; 328: 327-335
64. Wood EP, Braitstein JSG, Montaner MT, et al. Extent to which low-level use of antiretroviral treatment could curb the AIDS epidemic in Sub-Saharan Africa. *Lancet* 2000; 355: 2095-2100
65. Henry K. The case for more cautions, patient-focused antiretroviral therapy. *Ann Intern Med* 2000; 132: 306-311

66. Carr A, Samaras K, Thorisdottir A, et al. Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidaemia, and diabetes mellitus: a cohort study. *Lancet* 1999; 353: 2093-2099
67. Wynn GH, Zapor MJ, Smith BH, et al. Antiretrovirals, Part 1: Overview, history, and focus on protease inhibitors. *Psychosomatics* 2004; 45: 262-270
68. Saags MS. Initiation of antiretroviral therapy implications of recent findings. *Top HIV Med* 2004; 12: 83-88
69. Análisis de los costos de atención del VIH/SIDA en México. FONSIDA 2003. Disponible en: www.phrplus.org/Pubs/Tech02Osp.fin.pdf
70. Nicol AF, Gomes Fernandes AT and Bonecini-Almeida MG. Immune response in cervical dysplasia induced by human papillomavirus: the influence of human immunodeficiency virus-1 coinfection. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2005; 99: 1-12
71. Franco EL, Duarte FE, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ* 2001; 164: 1017-1025
72. Conley LJ, Ellerbrock TV, Bush TJ, et al. HIV-1 infection and risk of vulvovaginal and perianal condylomata acuminata and intraepithelial neoplasia: a prospective cohort study. *Lancet* 2002; 359: 108-113
73. Wright TC Jr, Ellerbrock TV, Chiasson MA, et al. Cervical intraepithelial neoplasia in women infected with human immunodeficiency virus: prevalence, risk factors, and validity of papanicolaou smears. New York Cervical Disease study. *Obstet Gynecol* 1994; 84: 591-597
74. Conti M, Agarossi A, Parazzini F, et al. HPV, HIV infection, and risk of cervical intraepithelial neoplasia in former intravenous drug abusers. *Gynecol Oncol* 1993; 49: 344-348
75. Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, et al. Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. *JAMA* 2000; 283: 1031-1037
76. Moscicki AB, Ellenberg JH, Vermund SH, et al. Prevalence of and risks for cervical HPV infection and squamous intraepithelial lesions in adolescent girls: impact of infection with human immunodeficiency virus. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000; 154: 127-134
77. Sun XW, Ellerbrock TV, Lungu O, et al. Human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus seropositive women. *Obstet Gynecol* 1995; 85: 680-686

78. Luque AE, Demeter LM, Reichman RC. Association of human papillomavirus infection and disease with magnitude of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA plasma level among women with HIV-1 infection. *J Infect Dis* 1999; 179: 1405-1409
79. Sun XW, Kuhn L, Ellerbrock TV, et al. Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 1997; 337: 1343-1349
80. Tweddel G, Heller P, Cunnane M, et al. The correlation between HIV seropositivity, cervical dysplasia, and HPV subtypes 6/11, 16/18, 31/33/35. *Gynecol Oncol* 1994; 52: 161-164
81. Six C, Heard I, Bergeron C, et al. Comparative prevalence incidence and short-term prognosis of cervical squamous intraepithelial lesions among HIV-positive and HIV-negative women. *AIDS* 1998; 12: 1047-1056
82. Levy JE, Kleter B, Quint WG, et al. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3341-3345
83. Moscicki AB, Ellenberg JH, Farhat S, et al. Persistence of human papillomavirus infection in HIV-infected and- uninfected adolescent girls: risk factors and differences, by phylogenetic type. *J Infect Dis* 2004; 190: 37-45
84. Minkoff H, Feldman J, Dehovitz J, et al. A longitudinal study of human papillomavirus carriage in human immunodeficiency virus-infected and human immunodeficiency virus-uninfected women. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178: 982-986
85. Ahdied L, Klein RS, Burk R, et al. Prevalence, Incidence, and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative women. *J Infect Dis* 2001; 184: 682-690
86. Palefsky JM, Minkoff H, Kalish LA. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J Nat Cancer Inst* 1999; 91: 226-236
87. Volkow P, Rubí S, Lizano M, et al. High prevalence of oncogenic human papillomavirus in the genital tract of women with human immunodeficiency virus. *Gynecol Oncol* 2001; 82: 27-31
88. Heard I, Tassie JM, Kasatchkine MD, et al. Highly active antiretroviral therapy enhances regression of cervical intraepithelial neoplasia in HIV-seropositive women. *AIDS* 2002; 16: 1799-1802

89. Minkoff H, Ahdied L, Massad LS, et al. The effect of highly active antiretroviral therapy on cervical cytologic changes associated with oncogenic HPV among HIV-infected women. *AIDS* 2001; 15: 2157-2164
90. Lillo FB, Ferrari D, Veglia F, et al. Human papillomavirus infection and associated cervical disease in human immunodeficiency virus-infected women: effect of highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2001; 184: 547-551
91. Heard I, Schmitz V, Castagliola D, et al. Early regression of cervical lesions in HIV seropositive women receiving highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 1998; 12: 1459-1464
92. Zehbe I and Wilander E. Two consensus primer systems and nested polymerase chain reaction for human papillomavirus detection in cervical biopsies: A study of sensitivity. *Human pathology* 1996; 27: 812-815
93. HIV/AIDS Surveillance report 2003; 14
94. Delmas MC, Larsen C, Benthem B, et al. Cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women: prevalence, incidence and regression. *AIDS* 2000; 14: 1775-1784
95. Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML, et al. Prevalence and risk factors for human papillomavirus infection of the anal canal in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative homosexual men. *J Infect Dis* 1998; 177: 361-367
96. Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML, et al. Prevalence and risk factors for anal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and high risk HIV-negative women. *J Infect Dis* 2001; 183: 383-391
97. Goncalves MAG, E Massad, MN Burattini, et al. Relationship between human papillomavirus (HPV) genotyping and genital neoplasia in HIV-positive patients of Santos City, Sao Paulo, Brazil. *Int J AIDS* 1999; 10: 803-807
98. Villa LL, Bernard HU, Kast M, et al. Past, present, and future of HPV research: highlights from the 19th International Papillomavirus Conference- HPV 2001. *Virus Res* 2002; 89: 163-173

ANEXO I

Estimada señora:

Queremos invitarla a participar en un estudio de Investigación. Para que usted pueda decidir si desea o no entrar en este estudio, es necesario que conozca el tipo de proyecto al que se le invita a participar. Su decisión final será con base a la información aquí contenida y no alterará en ningún momento su atención o tratamiento.

Usted recibirá información detallada sobre el estudio clínico. Una vez que haya comprendido los propósitos del mismo y acepte participar **tendrá que leer, firmar y fechar esta carta de consentimiento informado**. Si hay algo que no comprende o si tiene alguna pregunta, pídale a su médico que se lo explique antes de firmar este consentimiento.

¿Qué es el Virus del Papiloma Humano?

Es un virus que infecta el aparato genital en su porción inferior y cuya presencia incrementa el riesgo de padecer lesiones precancerosas o cáncer del cuello uterino.

¿Qué son las lesiones intraepiteliales o preneoplásicas del cérvix?

Son lesiones localizadas en el cuello uterino consideradas precursoras definitivas de cáncer del cuello uterino, por lo que deben ser diagnosticadas y tratadas oportunamente para prevenir su evolución hacia la etapa invasora del cáncer.

¿Cuál es la relación que existe entre la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana y el virus del papiloma humano?

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana condiciona inmunosupresión o disminución de las defensas locales del cuello uterino, por lo que a nivel genital existe mayor posibilidad de padecer enfermedades infecciosas o precursoras de cáncer.

¿Cuáles serán los padecimientos que se llevarán a cabo en el estudio?

Se le realizarán preguntas para obtener información relacionada a su enfermedad, exploración a nivel genital; con toma de Papanicolaou y muestras del cuello uterino para determinar por estudios especiales la presencia de infección por el virus del papiloma humano, estudio de colposcopia y en caso de observarse lesiones sospechosas, biopsia dirigida. Se realizará además toma de muestra sanguínea para determinar la cuenta de células CD4 en sangre.

¿Existen riesgos o molestias durante la realización del estudio?

No existe ningún riesgo adicional, al que implican las molestias al tomar la muestra del Papanicolaou, realizar la colposcopia o la toma de biopsia si así se requiere. Que independientemente si usted acepta o no participar en nuestro estudio serán realizadas como parte de su evaluación integral.

¿Cuáles son los posibles beneficios de mi participación en el estudio?

El poder diagnosticar y tratar oportunamente las lesiones precursoras de cáncer del cuello uterino.

ANEXO II

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se me ha informado adecuadamente sobre el propósito del estudio, naturaleza, duración y procedimiento del mismo.

Se me ha informado que los procedimientos que se tienen contemplados en el estudio, no tendrán ningún costo adicional. También se me ha informado que mi participación en este estudio no implica la administración gratuita de medicamentos ni la prestación gratuita de otros servicios por parte de la institución.

Es de mi conocimiento que son responsables de esta investigación las Dras. ¿ ? Y que cualquier duda o pregunta podrá ser contestada por ellos.

Toda información que se obtenga de este estudio permanecerá confidencial y será consignada al expediente correspondiente. No será identificada en ninguna publicación o presentación que parte de este estudio.

Mi participación en este estudio es voluntaria. Puedo negarme a participar o puedo suspender mi participación en cualquier momento, si así lo decido. En caso de que así lo haga, la atención que como paciente recibo de la Institución no se verá afectada.

He leído la información anterior y comprendo los propósitos del estudio, así como los beneficios y riesgos potenciales de mi participación en el mismo. He tenido la oportunidad para preguntar mis dudas y todas mis preguntas han sido aclaradas. Por tanto, DOY MI LIBRE CONSENTIMIENTO, para ser participante de este estudio. Me he quedado con copia de esta forma de consentimiento.

NOMBRE DEL PACIENTE _____

FIRMA DEL PACIENTE _____

TESTIGO _____

FECHA _____

Declaración del investigador o responsable de obtener esta carta de consentimiento

He dado a la paciente información detallada sobre el estudio con lenguaje sencillo y comprensible, incluyendo los riesgos y beneficios del mismo. Certifico que le solicité a la paciente que me expresara cualquier duda o comentario sobre este proyecto que respondí adecuadamente. El paciente ha consentido libremente en participar y ha confirmado este consentimiento firmado arriba

NOMBRE DEL MÉDICO _____

FIRMA _____