

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO**

**“TECNICA DE MICROARREGLOS PARA LA DETECCION DE VPH EN
PACIENTES CON DIAGNOSTICO COLPO-HISTOLOGICO DE LESION
INTRAEPITELIAL CERVICAL EN EL HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO”.**

**TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALISTA EN GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA**

**PRESENTA:
DRA. MARTHA PATRICIA RICO ACO**

**ASESORES DE TESIS:
DRA. FABIOLA FRAGOSO SANDOVAL
DR. FRANCISCO JAVIER HERNANDEZ ALDANA**

**PROFESOR TITULAR DEL CURSO
DE ESPECIALIZACION EN GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA:**

DR. JUAN JIMENEZ HUERTA



MEXICO, DF.

ENERO 2015



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.

CONTENIDO

Índice	2
Marco Teórico	3
Justificación, Objetivos, Pregunta de investigación, Hipótesis	22
Material y métodos, Metodología	23
Descripción operativa del estudio y cálculo de la muestra	26
Método estadístico	26
Hoja de captura de datos	27
Cronograma de actividades	28
Resultados	29
Discusión	45
Conclusiones	51
Bibliografía	53

INTRODUCCION

El cáncer cervico uterino (CaCu) es el segundo lugar en cáncer más común a nivel mundial y la principal causa de fallecimiento en mujeres en la mayoría de países en desarrollo¹. Cada año, 500,000 mujeres desarrollan cáncer cervico uterino y cerca de 275,000 mueren a causa de esta enfermedad. Para el 2030, se prevé que el cáncer cervico uterino cobrará la vida de más de 474,000 mujeres por año y se espera que más del 95% de estas defunciones tengan lugar en países de medianos y bajos ingresos².

Durante los últimos 40 años, las reducciones en la incidencia de cáncer cervicouterino han dado lugar a tasas significativamente bajas, inferiores a 10 casos por cada 100,000 mujeres, en Canadá, Estados Unidos y otras potencias, sin embargo, en la mayoría de los países de América Latina y el Caribe, las tasas anuales de cáncer cervico uterino se mantienen altas, generalmente por arriba de 17 casos por cada 100,000 mujeres¹. Globalmente, esta entidad se diagnostica a 490.000 mujeres y causa 273.000 muertes anuales³.

En México en el año 2001 se reportaron 4,051 muertes en mujeres por CaCu, para el 2002 se registraron 4,323 casos y 4270 defunciones en el 2005, equivalentes a una tasa de mortalidad de 8 casos por cada 100,000 mujeres. El 84% ocurrieron en mujeres con escolaridad primaria o menos y predominantemente en edad productiva¹. La prevención y el control del CaCu en México ha sido uno de los principales retos para la política de salud pública durante las últimas décadas.

Un estudio publicado en 2008, realizado con base en los datos de GLOBOCAN 2003, encontró que la tasa de mortalidad por esta causa en nuestro país (estandarizada por edad) fue la quinta más elevada de 21 países latinoamericanos (17.1 eventos por 100,000), mientras que la tasa de incidencia (estandarizada por edad) se encuentra entre las diez más elevadas de la región (40.5 eventos por 100,000). Todo esto a pesar de que desde 1974 se estableció un programa preventivo a nivel nacional denominado: "*Programa de Acción para la Prevención y Control del Cáncer Cérvico Uterino*"⁴. En cuanto a la mortalidad, aunque se observa una tendencia significativamente descendente de un 30.6% en el período 1980-2004, sigue siendo un importante problema de salud pública. Se estima que cada día ocurren 12 muertes por esta causa, por lo que su estudio sigue siendo prioritario⁴.

Para el diagnóstico de CaCu la prueba citológica de Papanicolaou (Pap) sigue siendo la prueba más aceptada para detectar lesiones cervicales precancerosas y/o la detección del carcinoma invasor, al igual que técnicas complementarias como colposcopia, biopsia, tipificación viral e inmuno-histoquímica/ inmunocitoquímica⁵. Sin embargo, el Pap frecuentemente detecta casos de CaCu ya avanzados debido a que su sensibilidad es mayor en lesiones precancerosas

^{5,6}

En los países de ingresos medios y bajos existe una deficiente implementación de políticas de prevención de CaCu, debido entre otros factores, a la escasez de recursos financieros, técnicos y humanos y aspectos culturales que limitan la aceptabilidad y el acceso a la prueba de tamizaje⁸.

Un descubrimiento importante en la etiología del cáncer humano, ha sido el reconocimiento de que el cáncer cervical es una rara consecuencia de una infección por algunos genotipos de Virus de Papiloma Humano (VPH)^{7,8}.

El estudio más extenso, ha sido el Estudio Biológico Internacional sobre Cáncer de cérvix realizado en 1993 (EBICCU), con más de 1000 biopsias procedentes de 22 países, con un ensayo basado en la técnica de PCR capaz de detectar a más de 25 tipos de VPH. Se detectó ADN de VPH en 92.7% de los tumores y los VPH detectados con mayor frecuencia fueron: 16, 18, 45 y 31. El genotipo 16 fue el más frecuente en todos los países a excepción de Indonesia en donde el genotipo 18 fue el más común. En el occidente de África se detectó un conglomerado de VPH 45, mientras que los genotipos 39 y 59 se detectaron casi exclusivamente en América Latina¹⁰.

Apoyando la evidencia epidemiológica de VPH y su relación con el CaCu se pudo observar en México que tiene que ver con la alta frecuencia de los sub genotipos virales de VPH 16 Asiático-Americanos detectados (23% de todos los cánceres del cuello uterino), los cuales son más oncogénicos que la virus Europeos, pudiera también contribuir importantemente a la alta incidencia de este cáncer¹⁰.

Se puede identificar una nueva cepa de VPH cuando la secuencia clonada del ADN del marco de lectura abierta (MLA) del gen L1 difiere en más del 10% respecto a la secuencia del genotipo de VPH más relacionado. Los subgenotipos del VPH presentan unas diferencias de homología de la secuencia nucleótida del 2 al 10% y las variantes se caracterizan por unas diferencias menores del 2%. Los virus Asiático-Americanos son muy frecuentes en México y uno de ellos, el virus AA se asocia a mujeres más jóvenes y a tumores histológicamente más oncogénicos que los virus genotipo 16 Europeos⁸.

Clasificación de lesiones precursoras del carcinoma de cérvix uterino.

En 1985, el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos propone una nueva clasificación orientada a la citología (llamada clasificación Bethesda)¹³, en la que se descarta el sistema de graduación de Papanicolaou así como la referencia al término NIC y se introduce el concepto de lesión intraepitelial escamosa

(Squamous Intraepithelial Lesión, SIL) de bajo grado y de alto grado (LIEBG, LIEAG).

En la lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIEBG) comprende epitelios que muestran cambios en su estructura y en las células, análogos a la displasia leve y al NIC I. Por lo general, se trata de lesiones auto limitadas que rara vez progresan a carcinoma invasor. La lesión intraepitelial escamosa de alto grado comprende epitelios con cambios idénticos a los descritos en la displasia moderada o grave, o a las características de NIC II o NIC III. Estas lesiones tienen un alto potencial de progresión hacia carcinomas invasores, por lo que constituyen auténticas lesiones¹³.

Las lesiones intraepiteliales de alto grado (LIEAG) citológicas no son equivalentes a NIC 2 o 3 (LIEAG) histológicas. Un resultado citológico de LIEAG presenta una notable correlación (>85%) con la infección por el VPH e indica un alto riesgo de afectación cervico-uterina grave, en el 53 al 66% de las mujeres que se diagnostica NIC 2 o 3 o cáncer tras la toma de biopsia¹⁵.

El sistema desarrollado originalmente por Papanicolaou ha sido substituido por el sistema de NIC (neoplasia intracervical) y el sistema de Bethesda que clasifica las displasias en bajo y alto grado. En la mayoría de los casos, éstas son lesiones precancerosas que pueden ser tratadas fácilmente con curación de casi 100%. El sistema de clasificación de NIC y el sistema de Bethesda son los más usados actualmente¹².

Tabla 1. Nomenclaturas usadas para clasificar las pruebas de PAP.

Sistema de Papanicolaou	Sistema de Richart	Sistema Bethesda
Negativa (I)	Negativa	Negativa
II	Atipia escamosa reactiva o imposible de clasificar	ASCUS- ASCH
III	Infección por VPH	Lesiones intraepiteliales de bajo grado de malignidad
III	Neoplasia intraepitelial cervical Grado I (NIC I)	Lesiones intraepiteliales de alto grado de malignidad
III	Neoplasia intraepitelial cervical Grado II (NIC II)	
III	Neoplasia intraepitelial cervical Grado III (NIC III)	
IV	Carcinoma in situ	
V	Cáncer escamoso invasor del cuello uterino	

Shingleton, M. Patrick, et.al. The Current status of Papanicolaou smears in cervical pathology" 2004

Mecanismos de transmisión

El coito no representa la única vía de transmisión del VPH genital, se ha descrito la transmisión vertical de la madre al neonato. Se estima que diferentes tipos de

VPH se suelen transmitir a la vez, resultando en una elevada proporción (20-30%) de infecciones concurrentes con diferentes genotipos de virus, comprobado cuando se toman muestras en la población general, los hombres se pueden infectar por diferentes genotipos de VPH concomitantemente, por lo que también puede transmitirlos en un único contacto sexual¹⁵.

Cofactores en la carcinogénesis cervical.

La asociación observada entre VPH y cáncer de cérvix, siendo esta entre las más consistentes de las identificadas en cancerología humana, existiendo un consenso creciente en calificarla como causa necesaria, pero no suficiente, ya que no todas las infecciones por VPH persisten o progresan a CaCu⁹.

Los lugares más susceptibles de invasión viral son aquellos donde se producen procesos de rápida replicación y diferenciación celular, como la zona de transformación escamocolumnar del cérvix y la línea pectínea anal, desarrollando displasias y neoplasias en estas localizaciones⁹.

La relación entre la edad y la prevalencia del VPH no sigue un patrón definido y parece variar alrededor del mundo en diferentes poblaciones⁹. Estudios han reportado que la mayor prevalencia se observa en mujeres menores de 25 años, disminuyendo progresiva y linealmente hasta alcanzar el 5% o menos después de los 55 años; esto pudiera explicarse por cambios en las prácticas sexuales con la edad, determinando una menor exposición de las mujeres al virus o también por la inmunidad adquirida con el tiempo a la infección⁶. En las mujeres jóvenes, el epitelio metaplásico de la zona de transformación escamo-cilíndrica es inmaduro, por lo que podría justificar el mayor riesgo de infección cuando el inicio de la actividad sexual es precoz, que a su vez se suma, mayor número de parejas y relaciones sexuales con parejas que tienen o han tenido múltiples compañeros sexuales⁷.

En otros estudios se describe un segundo pico en la prevalencia del VPH a partir de los 45 años de edad, explicando que cambios hormonales ocurridos después de la menopausia, el debilitamiento del sistema inmune y los cambios fisiológicos del cérvix (atrofias del epitelio) pudieran incrementar la susceptibilidad a la infección por el virus o activar infecciones previamente latentes⁹.

Tabaco: El tabaco tiene efecto carcinogénico directo y además produce alteración de la inmunidad local del cérvix, con un aumento del riesgo de progresión de 2-4 veces respecto a las no fumadoras, incluso el cese del tabaco se ha asociado a una disminución del tamaño de la lesión intraepitelial cervical. Se acepta que, junto a otros factores, aumenta 3 veces el riesgo de padecer la enfermedad comparada con las mujeres no fumadoras y se ha reportado que existe una fuerte relación dosis-respuesta¹⁶.

Multiparidad: Existen estudios casos-control que relacionan la alta paridad con LIEAG y carcinoma de cérvix, en que asocian un riesgo incrementado con un riesgo 2 a 6 veces más alto en las multíparas de presentar cáncer que las nulíparas y se incrementa el riesgo con 7 o más partos. El motivo de esta asociación no está muy claro, pero podrían ser las modificaciones hormonales durante el embarazo que modulan locamente la respuesta inmune, los cambios cervicales por el traumatismo del parto o una mayor persistencia de la zona de transformación exocervical¹⁶.

Anticonceptivos hormonales: Su empleo durante cinco o más años actúa como un co-factor para CaCu y aumenta el riesgo a medida que se suman los años de consumo. Se cuadruplica el riesgo cuando el uso es superior a diez años ya que existe un cambio en la respuesta inmunitaria local, por otro lado, se estima que el riesgo disminuirá después de ocho años de haberlos suspendido¹⁶.

Circuncisión masculina: Como factor de riesgo de la infección genital por el VPH tanto en mujeres como en hombres es dispar. Los hombres circuncidados tienen menos riesgo de infectarse y de ser transmisores, posiblemente debido a la dureza del epitelio queratinizado, por lo tanto la circuncisión masculina supondría un efecto protector en la mujer¹⁶.

Enfermedades de transmisión sexual: Chlamydia trachomatis (serotipos I, D y G), relacionada con VPH debido a la inflamación crónica y la producción de mutágenos que ocasiona; incluso de le ha llegado a considerar como factor independiente del VPH en la carcinogénesis cervical¹⁶.

Factores genéticos del huésped

Estudios experimentales han demostrado que los cambios en la transcripción del VPH están asociados a modificaciones en el ADN, que en ciertas personas serían responsables de la transformación e inmortalización celular; se ha documentado una delección en el cromosoma 11, ya que en general las delecciones en esta región se asocian a una desregulación^{5,6}.

Respuesta inmune del huésped

Se ha señalado que la inmunidad natural sería un importante factor modulador de la infección por el VPH y la enfermedad relacionada con la misma; sin embargo, la caracterización de respuestas inmunitarias específicas entraña dificultades debido a que los VPH han evolucionado para eludir su reconocimiento por el sistema inmunitario del organismo huésped. A menudo resulta imposible cuantificar las respuestas de escasa intensidad mediante las técnicas inmunológicas disponibles en la actualidad⁹. La aparición de anticuerpos específicos frente al VPH

detectables o respuestas celulares es menos probable en las mujeres con infecciones transitorias que en aquellas con infecciones persistentes. Por ello, la inmunidad innata podría desempeñar un importante papel en la resolución de muchas infecciones por el patógeno. Los anticuerpos específicos para el VPH se asocian con la exposición previa al virus, pero no parecen conferir protección frente a la persistencia o la afectación por el VPH. En los estudios longitudinales de cohortes, rara vez se detecta de nuevo un genotipo determinado del VPH tras la resolución de la infección por el mismo¹⁵.

Biología del VPH

Taxonómicamente el virus del papiloma humano pertenece a la familia *Papillomaviridae*, compuesta por 16 géneros. Los tipos virales del género alpha papillomavirus se caracterizan por ser causantes de lesiones mucosas y cutáneas en humanos y primates⁹.

Según su riesgo oncogénico, se clasifican en tipos de VPH de bajo riesgo (VPH-BR), VPH de probable alto riesgo y VPH de alto riesgo (VPH-AR) Tabla 2.

Se debe tener en cuenta que ciertos tipos virales pueden aparecer en lesiones cancerosas como resultado de una co-infección y no ser agentes etiológicos causantes de la transformación tumoral. Las lesiones neoplásicas cervicales, vulvares, vaginales, peneales y anales se asocian con frecuencia con VPH de alto riesgo oncogénico y ocasionalmente con VPH de bajo riesgo^{6,9}.

Tabla 2. Clasificación de VPH según riesgo oncogénico

CLASIFICACIÓN VPH	
VPH-AR	26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82, 70, 85
VPH PROBABLE AR	53, 66
VPH-BR	6, 42, 84, 61, 35, 11, 54, 81, 43, 44, 62, 71, 74

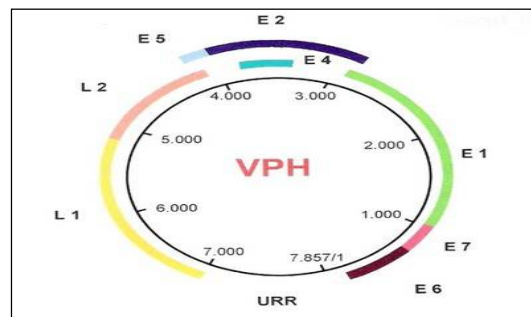
Edurne Mazarico Gallego "Relación existente entre la infección por los diferentes genotipos de 86 VPH y la presencia de patología premaligna y maligna del cuello uterino" Barcelona España 2012.

Los papilomavirus son de las especies que infectan y tienen un tropismo muy definido por las células del tejido epitelial estratificado queratinizado. Las primeras capas celulares proporcionan un reservorio celular y también son un perfecto espacio para la propagación viral⁹.

Como es lógico, los estudios epidemiológicos atribuyen variaciones poblacionales importantes en la prevalencia y relación causa/efecto de los diferentes tipos virales, sin embargo, es indudable la gran prevalencia o implicación en las patologías de alto grado y carcinomas que a nivel mundial tienen los genotipos 16 y 18, en comparación con los genotipos 6 y 11 que tienen patologías de tipo condilomatoso⁵.

El VPH se caracteriza por ser un virus pequeño con un genoma de ADN circular, de doble cadena de aproximadamente 8,000 pares de bases de longitud, y una cápside proteínica icosaédrica. Su genoma contiene de 9 a 10 regiones codificantes involucradas en la regulación de las funciones virales y las proteínas estructurales implicadas en la producción de partículas⁶.

Figura 1. Representación esquemática del genoma circular de VPH



Marcela Lizano-Soberón¹, Adela Carrillo-García¹ y Adriana Contreras-Paredes *"Infección por Virus de Papiloma humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis"*

Para efectos funcionales y didácticos, el genoma viral puede dividirse en tres regiones⁹:

- a) Región de genes tempranos (E, del inglés Early) que codifican proteínas involucradas en la replicación de ADN viral, regulación transcripcional y transformación celular. E1, E2, E4, E5, E6 E7.
- b) Región de genes tardíos (L, del inglés Late), que codifican proteínas de la cápside viral. L1, L2.
- c) Región de control (LCR, Long Control Región) o también denominada URR (Upper Regulatory Región), que no contiene genes, pero sí importantes elementos de regulación transcripcional y replicacional en donde se localizan los promotores que inician la replicación.

Los oncogenes codifican proteínas, que recuerdan a los productos normales de los proto-oncogenes, con la excepción que las onco-proteínas que se encuentran libres de elementos reguladores y su producción en las células transformadas no depende de factores de crecimiento o de otras señales externas.

Las oncoproteínas tienen una función estimuladora sobre el crecimiento celular, muchos de los productos de estos genes parecen interactuar unos con otros como componentes de una compleja red de control. Así, algunos proto-oncogenes codifican factores de crecimiento, otros codifican receptores de los factores de crecimiento (VEGF, fms c-erb-B1, c-erb-B2, c-erb-B3), otros codifican proteínas envueltas en señales de transducción, entre las que se encuentran las proteína quinasas y las proteínas transportadoras, proteínas G y proteínas de la familia *ras* (VEGF, H-ras, K-ras), y otros codifican proteínas reguladoras de la actividad génica localizadas en el núcleo (VEFG, myc, myb, jun, fos)⁹.

Las proteínas E1 y E2 tienen acciones moduladoras importantes sobre la replicación del ADN viral ya que codifican proteínas que actúan sobre los promotores en la zona LCR y E4 codifica proteínas que interactúan con proteínas del citoesqueleto celular⁹.

La proteína E2 es una proteína de unión al ADN que ayuda a reclutar a E1 al origen de la replicación, pero también juega un papel en la regulación de la transcripción viral. Entre las primeras proteínas virales expresadas se encuentran los factores de replicación E1 y E2, los cuales forman un complejo, uniéndose al origen de la replicación viral. Las proteínas E2 de tipo viral de alto riesgo contienen 4 sitios E2BS ubicados en la región LCR, que hayen hacia el promotor viral que regula la expresión de los genes tempranos. La unión de E2 al DNA provoca la activación o represión de dicho promotor y la replicación del DNA viral. Estas funciones dependen de la concentración intracelular de E2. También tiene una función anti proliferativa, pues puede reprimir el crecimiento e inducir apoptosis, mediante la represión de la transcripción de E6 y E7, así como el aumento de p53⁹.

El gen E6 codifica para una proteína de aproximadamente de 150 aminoácidos y contienen dos motivos de dedos de Zinc altamente conservados; caracterizados por la presencia del motivo Cys-X-X-Cys cuya integridad es esencial para su función. E6 regula la transcripción viral, disminuye la diferenciación celular y las interacciones célula a célula, e incrementa la inestabilidad cromosómica. La proteína E6, puede asociarse con el producto del gen supresor de tumores p53 y marcarlo para su degradación esta es mediada por otra proteína, que es E6-AP, una ligasa ubiquitina que hace perder fuerzas a proteínas destinadas a la degradación a través del proteosoma⁹.

La unión de E6 a p53 conduce a la degradación de p53⁶ como se muestra en la fig 2. (La proteína p53, es un factor de transcripción que estimula la expresión de genes involucrados en la regulación del ciclo celular y apoptosis). En ausencia de p53, los reguladores negativos del ciclo celular no son expresados y la

proliferación celular sigue incluso en condiciones en las cuales la división celular es perjudicial, conduciendo a mutaciones y anomalías cromosómicas^{6,9}.

E6 puede asociarse con el producto del gen supresor de tumores p53 y marcarlo para su degradación⁹. Las condiciones de estrés celular como radiación UV, hipoxia o infecciones virales inducen la acción de la proteína p53, la cantidad de la proteína puede ser incrementada por estabilización post-transcripcional, produciendo un bloqueo celular en la fase G1. Este bloqueo, permite a la célula reparar el daño al DNA antes de que el ciclo celular continúe⁹. Además, la E6 induce a la actividad de la telomerasa, la cual conduce a la inmortalización de la célula, altera la función y la desregulación de la transición G1/S^{6,9}.

Gen p53

El proceso de replicación es controlado por un grupo de proteínas que tienen por finalidad supervisar el ciclo celular de manera que una célula no entra en una nueva fase hasta no haberse restaurado su genoma celular esto es necesaria con una previas comprobaciones denominadas puntos de chequeo (checkpoint)⁹. La finalidad de esta supervisión radica en que la célula sólo se divida cuando sea preciso y respondiendo siempre a niveles de control más elevados a nivel supracelular. Asimismo, estas comprobaciones son necesarias para asegurar que las copias del ADN que se generan sean iguales a la molécula progenitora evitando la introducción de fallos o errores en el proceso de duplicación o replicación⁹.

Figura 2.- Representación esquemática de la degradación de p53.

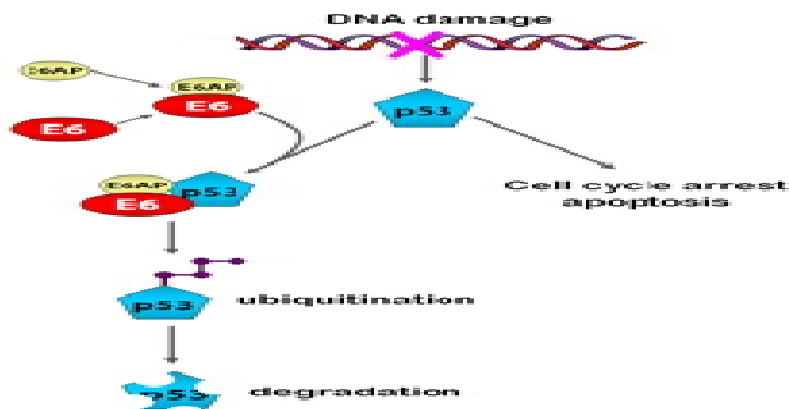
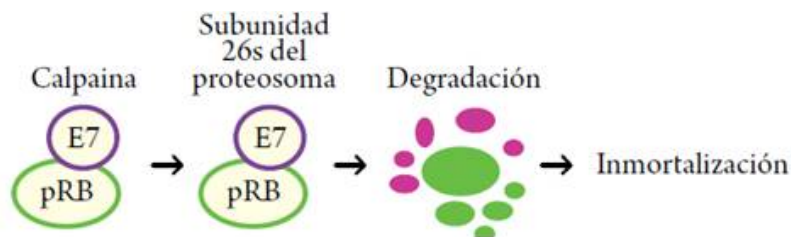


Figura 2.- Daño en el ADN que induce la activación de p53: detención del ciclo celular o apoptosis. E6 se une a E6-AP y la dirige a p53, que se traduce en la ubiquitinación E6-AP-mediada y la rápida degradación proteasomal de p53. Marcela Lizano-Soberón1, Adela Carrillo-García1 y Adriana Contreras-Paredes "Infección por Virus de Papiloma humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis"

La oncoproteína E7, es un pequeño polipeptido de aproximadamente 100 aminoácidos⁹. Al igual que E6, E7 posee un sitio de dedos de zinc en su extremo carboxilo terminal, el cual se utiliza para su dimerización. La proteína E7, es fosforilada por la caseína II (CK II) en el dominio N-terminal y está conformada por tres dominios llamados CD1, CD2 y CD3. Estos dominios conservados, son críticos para las actividades transformantes para cada una de estas oncoproteínas, a través de estos dominios, estas proteínas interactúan con una gran variedad de proteínas celulares, incluyendo al producto del gen supresor de tumores del retinoblastoma pRb⁵ Figura 3.

Figura 3. Degradación de pRB mediada por E7



Marcela Lizano-Soberón¹, Adela Carrillo-García¹ y Adriana Contreras-Paredes
"Infección por Virus de Papiloma humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis"

Se sabe que, la proteína E7 interactúa con p/CAF reduce su actividad de acetiltransferasa⁶, a si mismo, se ha reportado que esta enzima funciona como un coactivador de la transcripción de otros genes como p53, así que su inactivación además de la degradación de pRb, podrían explicar supresión de la diferenciación de los queratinocitos inducida por E7⁹.

Gen Retinoblastoma (Rb)

El gen Rb reside en 200 kb de ADN en el cromosoma 13 en la banda 14 y está formado de 27 axones, su proteína está localizada en el núcleo celular y su peso es de 10 a 110 kDa⁶. Esta proteína se encuentra en las células en reposo, en la fase G0 o G1, formando un complejo con el factor de transcripción llamado E2F, éste regula la activación transcripcional de varios genes virales y celulares, el cual a su vez regula enzimas que sintetizan nucleótidos y polimerizan el DNA. Cuando el complejo *Rb-E2F* se expone a la proteína E1A del adenovirus, el E2F es liberado y aumenta su habilidad para transcribir DNA y activar genes para que la célula entre a la fase S del ciclo. Las mutaciones en el sitio de unión de Rb, liberan al factor de transcripción e impiden regular sus actividades en el ciclo celular. Los productos que liberan oncogenes virales actúan uniéndose al Rb (con mayor afinidad que E2F) liberando los factores de transcripción^{6,9}.

Historia Natural de la Infección por VPH

La infección por VPH esencialmente es una enfermedad de transmisión sexual. De esta manera, tanto hombres como mujeres están involucradas en la cadena epidemiológica de la infección, pudiendo ser portadores asintomáticos, transmisores y también víctimas de la infección por VPH⁴. Es por ello que los factores asociados con dicha infección esencialmente están relacionados con el comportamiento sexual, como es la edad de inicio de vida sexual, un alto número de parejas sexuales a lo largo de la vida, o contacto sexual con individuos de alto riesgo^{5, 6, 7}.

Las infecciones genitales por VPH pueden detectarse en cérvix, vagina y vulva en mujeres; glande, prepucio, piel del pene y escroto en hombres; en canal anal y perianal tanto de mujeres como de hombres^{4, 6}.

Aun cuando en personas jóvenes la infección por VPH es muy frecuente, la mayoría de las mujeres infectadas resuelven la infección espontáneamente alrededor del 90%, en donde solo en una pequeña fracción de las mujeres persiste⁶. En este grupo de portadoras crónicas de VPH quienes pueden presentar un riesgo incrementado de desarrollar lesiones en el tracto anogenital⁹.

Algunos factores determinantes que han sido asociados a la progresión de las lesiones son: El tipo viral y las variantes del genotipo del VPH, la integración del genoma viral al celular y probablemente la carga viral. Otros factores adicionales incluyen la alta paridad, tabaquismo, la dieta pobre en vitaminas y minerales¹²⁻¹⁴. Muchos tipos de VPH inducen solamente lesiones productivas y no se asocian a cáncer humano. En dichas lesiones, la expresión de los productos de los genes virales se encuentra cuidadosamente regulada, de modo que las proteínas virales se expresan en momentos definidos y en cantidades controladas a medida que la célula infectada migra hacia la superficie epitelial.

Los eventos que dan lugar a la producción de partículas virales en las capas superiores del epitelio, parecen ser comunes tanto en virus de alto como de bajo riesgo oncogénico. De esta manera, el cáncer es una consecuencia poco frecuente de la infección por VPH y los eventos iniciales que conducen a la transformación maligna por virus oncogénicos no están del todo esclarecidos. Una posible explicación viene que de la zona del epitelio de transformación cervical, es un sitio del epitelio donde los VPH de alto riesgo al unirse su genoma viral con el genoma celular y en el momento del proceso del ciclo celular, no logran regular apropiadamente su ciclo productivo; por lo tanto, la variación tanto en el nivel de expresión de las proteínas virales, como del momento en que esta expresión ocurre, puede repercutir en el desarrollo de cánceres en estos sitios.

Durante la infección del VPH solo la mitad de las mujeres desarrollan anticuerpos contra el VPH detectables, los cuales probablemente no son protectores¹⁵. Los VPH infectan el epitelio cervical sin entrar en la circulación, por lo que las partículas no se exponen eficazmente al sistema inmune. Como resultado, la vigilancia inmunológica típica, que involucra el tráfico de células especializadas desde el sitio de la infección hasta órganos linfoides secundarios, se encuentra limitada o abatida. Aunado a esto, una vez dentro de la célula, la partícula del papilomavirus puede utilizar múltiples mecanismos para abatir la respuesta inmune que es necesaria para la eliminación de la infección¹⁶.

Los papilomavirus humanos también pueden alojarse de forma latente en las células epiteliales, evadiendo la detección por el sistema inmune y permitiendo una reactivación futura. Actualmente, solo hay evidencias indirectas de las infecciones latentes de VPH en humanos, pero se especula que aun cuando el VPH no pueda ser detectado en una muestra en un momento dado, permanece la posibilidad de que el virus se encuentre en forma latente¹⁵. La reactivación de infecciones latentes de VPH se ha reportado en pacientes inmunocomprometidos¹⁷.

Técnicas de detección de VPH

Los cambios morfológicos que provoca la infección por el VPH constituyen un espectro de lesiones que van desde alteraciones celulares transitorias, pasando por cambios neoplásicos pre-malignos, hasta llegar al carcinoma invasivo. En las lesiones pre-invasoras producidas por el VPH la lesión no es visible por lo que el diagnóstico se realizará mediante métodos auxiliares.

❖ Citología

Fue descrita por vez primera por Papanicolau en 1943, basándose en el hecho de que los diversos tejidos que revisten el tracto genital descaman células continuamente que se acumulan en el interior de las cavidades naturales. El epitelio vaginal se renueva cada 8 días y el endocervical cada dos semanas. En condiciones patológicas la descamación es más intensa, ya que hay una disminución de las fuerzas cohesivas entre sí¹⁸. La morfología de las células exfoliadas indica la normalidad o anormalidad de los tejidos de donde proceden, es por ello que la citología se ocupa del estudio de las células descamadas de los tejidos, tanto en condiciones normales como patológicas^{17, 18}.

La citología: detecta la presencia de coilocitos, disqueratocitos y la binucleación. Son los tres aspectos más característicos de la infección por VPH. Los coilocitos son células superficiales e intermedias que fueron descritas por Ayre en 1949 (las llamó células precancerosas en ese entonces) y se identifican por un gran halo perinuclear claro, que rechaza el citoplasma hacia la periferia, muy característico y se denomina halo coilocítico²¹.

Técnica para toma de citología: En la zona de transformación se hace un barrido con espátula de Ayre, en endocervix con un hisopo o cepillo, el fondo vaginal con espátula de madera o pipeta y estas muestras se colocan en una lámina que inmediatamente es fijada con fix-cell o laca^{18, 19}.

La técnica de Papanicolau ha sido prácticamente usada sin cambios desde hace 50 años, lo cual pone de manifiesto su elevada eficacia. Sin embargo, durante los últimos 10 años ha habido avances tecnológicos que han destacado por encima de esta técnica¹⁹.

❖ **Citología en fase líquida (CFL):**

En ella el contenido de las muestras no es depositado en una lámina, sino que es colocado inmediatamente en un recipiente que contiene un conservante líquido y, al llegar al laboratorio, las células son aspiradas sobre un filtro y teñidas sobre una laminilla. En esta técnica hay dos aspectos a resaltar¹⁷:

-La laminilla tiene una preparación celular extendida mas homogéneamente, sin grumos y sin células blancas que puedan interferir en su interpretación.

-El residuo líquido puede ser utilizado para pruebas adicionales, como la detección del VPH sin necesidad de realizar una nueva toma.

Se ha afirmado que la CFL es más sensible que la citología convencional. En un extenso estudio llevado a cabo en el Reino Unido en el que participaron 100.000 mujeres se puso de manifiesto que la CFL redujo las extensiones defectuosas en un 80%, reduciendo sustancialmente el número de toma de muestras para repetir la citología y aumentando la productividad del laboratorio. También reportó que ofrecía una buena relación costo-beneficio, por lo que el Instituto Nacional de Excelencia Clínica recomendó su implementación a escala nacional, convirtiéndose la CFL en el método de elección en los Estados Unidos y Reino Unido¹⁸.

❖ **Colposcopia**

Ante el resultado de una citología anormal, debe establecerse siempre que sea posible, un diagnóstico de confirmación basado en el estudio histológico del tejido afectado. Para esta finalidad, la colposcopia es la técnica de elección ya que es un método insustituible en el protocolo de diagnóstico y tratamiento de las lesiones intraepiteliales y del cáncer inicialmente invasivo del tracto genital inferior (TGI)¹⁹.

La colposcopia consiste en la observación aumentada del epitelio cervical y la trama vascular sub epitelial con un microscopio binocular de poca magnificación, dispone de varios aumentos, desde el 6X hasta el 40X, pero los más útiles son el 8X y el 20X. Posee además un filtro verde para destacar los patrones vasculares¹⁷.

La colposcopia es un método indispensable para el diagnóstico de la infección VPH subclínica en el cuello uterino y la vagina; la vulvoscopía para la vulva, el periné y el pene se utilizan penoscopia o androscopia. Este método nos permite evaluar la extensión de la lesión siendo de gran ayuda para decidir el lugar donde debe realizarse la biopsia²¹.

El procedimiento de técnica consiste en realiza primero una inspección del cuello con solución salina para observar la presencia de alteraciones cervicales visibles, posteriormente se aplica una solución de ácido acético al 3-5%, esta sustancia tiene la particularidad de producir una coagulación de las proteínas nucleares adquiriendo estas una tonalidad blanquecina y realizando así aquellas zonas de densidad nuclear aumentada, el objetivo fundamental es que nos permite obtener una mejor muestra con infección de VPH de la biopsia dirigida por colposcopia¹⁸.

Biopsia dirigida

Permite confirmar el diagnóstico antes de efectuar el tratamiento definitivo y se considera el patrón estándar en el diagnóstico de las lesiones cervicales. En toda colposcopia debe realizarse una evaluación integral de la unión escamo-columnar, de lo contrario será considerada como insatisfactoria¹⁸.

Toda lesión colposcópica sospechosa debe realizarse una biopsia¹⁹. Básicamente, las verrugas genitales en muy pocas ocasiones precisan una confirmación histológica, dado su escaso porcentaje de asociación con lesiones preneoplásicas. No obstante, se recomienda biopsia en todos los condilomas cervicales localizados en la unión escamo-columnar y en el resto del tracto genital inferior sólo en casos de duda. También se realiza el procedimiento en el caso de cuando la lesión no responde al tratamiento o incluso empeora durante el mismo, esto es en pacientes inmunodeprimidos o cuando son pigmentados, fijos y ulcerados, en todo caso de condiloma gigante o de lesiones papulares o maculares, por la posible patología neoplásica o preneoplásica añadida^{17, 19}.

Los epitelios acetoblanco en el cuello uterino deben biopsiarse, especialmente los que están localizados en la unión escamo-columnar por su implicación en las lesiones precursoras, en la vagina sólo se biopsiarán los epitelios blancos extensos o que presenten signos colposcópico de agravación, puesto que pueden incluir lesiones intraepiteliales vaginales (VAIN) más raras¹⁹. En vulva, dada la escasa especificidad de los epitelios blancos en esa localización, por la existencia frecuente de procesos inflamatorios y atrófico, sólo se aconseja biopsiar aquellos que aparezcan bien delimitados y/o multifocales con tendencia a confluir^{8, 19}.

El examen histológico es el método diagnóstico clave de las lesiones pre-malignas del cérvix uterino¹⁸. Todo diagnóstico de las lesiones intraepiteliales de alto grado y

de carcinoma invasivo debe estar fundamentado en el examen anatomopatológico^{18,19}.

La histología: detecta los cambios morfológicos visibles por la microscopía convencional que ocurren, y ellos son: crecimiento nuclear e hiper cromasia, aumento en la relación núcleo/citoplasma y halos perinucleares^{21, 18}.

Los criterios utilizados en colposcopia, son similares a los empleados en la citología donde se observan alteraciones en el tamaño núcleo, con hiper cromasia e irregularidad de los contornos nucleares¹⁷. Una vez establecido el diagnóstico de NIC, la graduación de la lesión se realiza según la gravedad de la alteración madurativa, afectando al tercio inferior en los NIC I y todo el epitelio en los NIC III^{18,19}.

Estudios recientes indican que la citología de papanicolaou no es un método adecuado para detectar el HPV, ya que los coilocitos y los disqueratocitos observados son marcadores específicos de las infecciones floridas, por lo que esta técnica no logra detectar la mayoría de las infecciones por VPH. La exactitud de la prueba de papanicolaou está limitada por falsos negativos, esto se debe a una muestra insuficiente, y / o al realizar la lectura, logrando una precisión de apenas 15% en la detección de infección por HPV^{18, 20}.

Por otra parte, el examen colposcópico tiene una alta sensibilidad pero una baja especificidad, además de que lleva a toma de biopsias innecesarias. El estándar ideal para un diagnóstico definitivo de cáncer es la biopsia seguida de histología, no obstante, tiene la desventaja de que requiere de un experto que interprete la información microscópica–histopatológica obtenida y esto con lleva un margen de error humano²⁰.

❖ Técnicas moleculares

Dado que el VPH no puede crecer en cultivos celulares convencionales y las pruebas serológicas son poco fiables, las técnicas moleculares constituyen la mejor elección para el diagnóstico de la infección por VPH¹⁹.

Las pruebas moleculares para la detección del VPH su finalidad es de analizar la presencia de secuencias de ADN viral basándose en la especificidad complementaria de un fragmento del ADN de la cápside del VPH.

El modo de detección de los híbridos, la composición de las sondas de ADN y la existencia o no de amplificación marcan las diferencias entre las diferentes técnicas²⁰.

Las pruebas de ADN del VPH surgieron como una nueva opción para el diagnóstico de cáncer cervical; la sensibilidad del uso combinado de la prueba del VPH y de la citología es significativamente mayor que la de cualquiera de las pruebas por sí mismas y tiene un valor predictivo negativo del 99%²⁰.

Otras investigaciones indican que las pruebas de ADN del VPH podrían llegar a convertirse en un método de cribado primario para las mujeres de 35 años o más. En mujeres, con diagnóstico citológico negativo, para el análisis de detección de VPH, con una sensibilidad para lesión de alto grado en donde se situaría cerca del 80 al 90% (más elevada que la prueba citológica) y la especificidad oscilaría entre el 75 al 89%²⁰.

Métodos de detección de ADN del VPH

Las técnicas de biología molecular han sido extensamente utilizadas para detectar y subdividir los tipos de VPH en tres categorías: los de alto, intermedio y bajo riesgo oncogénico^{6, 20}.

Las pruebas para la detección del VPH analizan la presencia de la región de L1 de la cápside viral²¹. En la actualidad se disponen de varias técnicas moleculares sensibles, fiables y reproducibles que han mejorado notablemente los resultados que se obtenían con otras técnicas que fueron implementadas anteriormente¹⁹.

- ❖ **Métodos de amplificación de señal:** El único sistema basado en esta tecnología es el test de Captura de Híbridos. Esta prueba incluye dos mezclas de sonda, una para la detección de trece tipos de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y otro para la detección de 5 tipos de bajo riesgo (6, 11, 42, 43 y 44). El ensayo puede realizarse con la sonda de bajo o alto riesgo. El objetivo de esta técnica es demostrar la presencia de DNA del HPV en los núcleos de las células infectadas representadas en un corte incluido en parafina como es habitual en los estudios histológicos²¹. Fue la primera prueba que se inicio la identificación del VPH en muestras de cepillado cervical o muestras de biopsias en parafina²¹.

El método de captura de híbridos ha sido utilizado ampliamente en el diagnóstico de infección, con una elevada reproducibilidad. Sus características de ser estandarizado, validado y con posibilidad de automatización en su procesamiento, hacen que sea una técnica de elección para ser propuesta como tamizaje inicial y seguimiento de los pacientes, sin embargo tiene como inconvenientes²¹.

- 1.- Discrimina entre los tipos de alto y bajo riesgo, no permitiendo la identificación del genotipo de VPH.

2.- Se han descrito hibridización cruzadas entre los grupos de alto y bajo riesgo.

3.- Su sensibilidad es algo inferior a la PCR.

La Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Permite amplificar el DNA viral, lo que la hace una técnica dotada de alta sensibilidad; detectar 10 copias de DNA viral entre un millón de células²⁰. Su principal ventaja es que permite identificar el tipo específico de VPH, permitiendo así la identificación de pacientes portadoras de VPH^{20, 21}.

❖ **Microarreglos**

Los microarreglos de ADN son un conjunto de secuencias que se ordenan y fijan en una superficie plana de vidrio, preparada químicamente, para realizar su estudio. Hay dos tipos de microarreglos de ADN:

a) microarreglos de ADN complementario (ADNc), donde se amplifican las transcripciones de interés mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa y se depositan en los lugares definidos en un papel de nitrocelulosa o una laminilla de vidrio²².

b) microarreglos de oligonucleótidos, en los que pequeñas secuencias de bases de un gen se sintetizan y fijan en un sitio particular de la laminilla²².

El ARNm de un tejido de interés se convierte en ADNc y se marca por métodos radioactivos o fluorescentes; la identificación de genes expresados de dos muestras se realiza con la formación de híbridos entre el ADNc marcado y la sonda (ADNc u oligonucleótidos no marcados y unidos a la superficie) y otros métodos de detección²².

Los microarreglos de ADNc y oligonucleótidos se han usado ampliamente en varios estudios; la diferencia radica en el número de genes por centímetro cuadrado: en un papel de nitrocelulosa; puede haber cientos de genes y en una laminilla (portaobjetos convencional) secuencias de 10,000 hasta 25,000 genes para ADNc y oligonucleótidos respectivamente. En la actualidad, se conocen microarreglos de oligonucleótidos de 400,000 secuencias (más de una por gen).

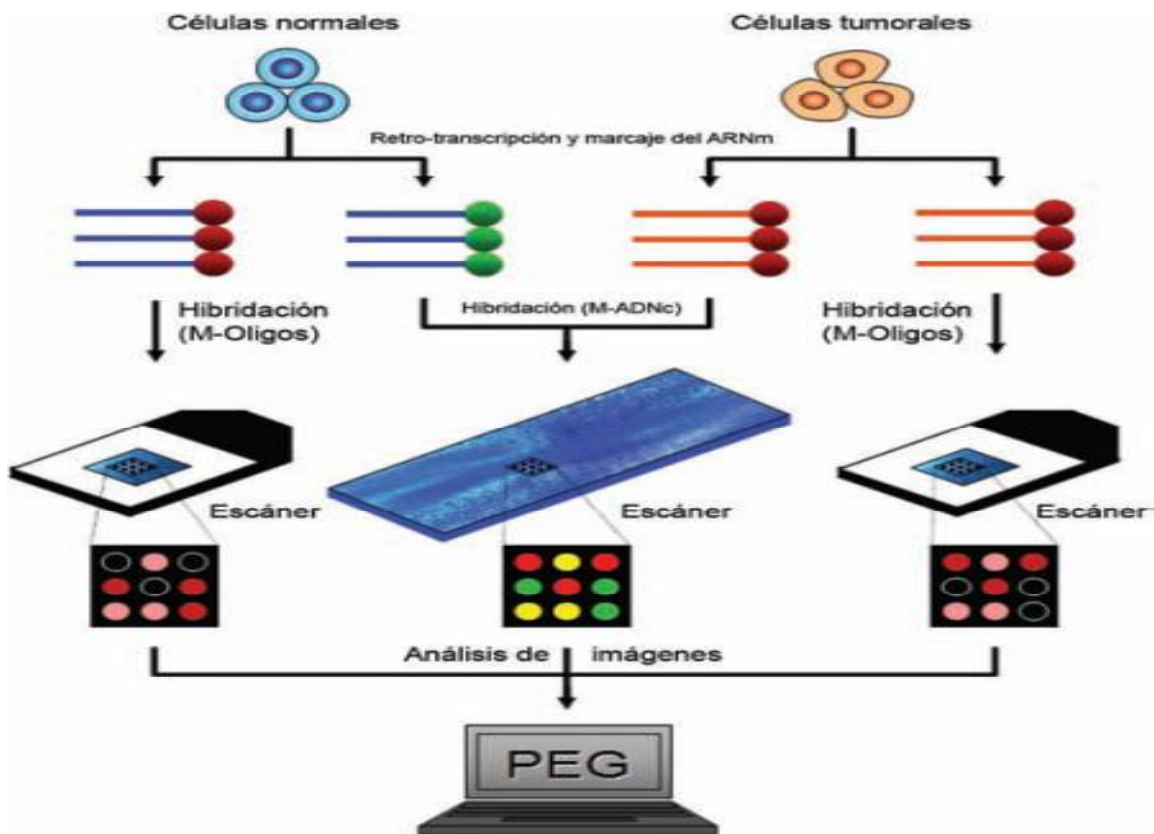
El alto rendimiento de los microarreglos permite la cuantificación simultánea de la transcripción de miles de genes en dos muestras y su marcación se realiza con distintos fluorocromos²². Por ejemplo, si se marcan las transcripciones de células tumorales con fluorocromo de color rojo y las células normales con color verde, al momento de localizar y comparar los puntos del microarreglo se observarán puntos rojos que corresponden a genes expresados diferencialmente en el tumor, puntos verdes que corresponden al tejido sano y puntos amarillos que corresponden a los genes expresados en ambos tejidos. Esta comparación

directa (en un solo experimento) se hace con microarreglos de ADNc y oligonucleótidos.

No obstante, existen diversas plataformas que utilizan un solo color para comparar dos muestras por separado. La intensidad de los puntos se transforma en cantidades numéricas que estiman los niveles de transcripción encontrados en cada muestra. Los datos se analizan por computadora y con algoritmos matemáticos para determinar los genes que definirán el “perfil de expresión génica” relacionado con el fenotipo de distintas muestras²².

Según las intensidades de expresión de los distintos genes, la muestra tumoral o la sana adquieren el “retrato molecular” o “firma de expresión” particular como se muestra en la figura 4.

Figura 4. Procedimiento general para el uso y análisis de microarreglos de ADNc.



CG Acevedo Rocha, E Álvarez, G Zafra de la Rosa, M Álvarez Navarro, P Gariglio "Microarreglos de ADN y cáncer cervicouterino: identificación de marcadores tumorales"*

Estudio de la carcinogénesis en líneas celulares.

Uno de los eventos clave para padecer CaCu es la infección de VPH-AR. Con la tecnología de los microarreglos se han evaluado los perfiles de expresión génica en líneas celulares y en cultivos primarios de queratinocitos humanos que contienen este tipo de virus²¹. Estas investigaciones demuestran que el VPH-AR, en comparación con el VPH-BR, induce la sobreexpresión de mayor cantidad de genes del factor de crecimiento tumoral beta (TGF β) y no suprimen los genes inducibles por interferones. De esta manera, los genes de la familia TGF β funcionan como supresores tumorales a tiempos tempranos del desarrollo neoplásico y los interferones contrarrestan las infecciones virales a través del sistema inmunitario^{21, 22}.

Tales hallazgos explican la forma de eliminación del VPH-AR en estado episomal (genoma en forma circular). Otro evento importante es la integración de genomas virales en el genoma celular. En la integración del ADN viral se pierde la expresión de la proteína E2, la cual detiene la expresión de E6 y E7. En las líneas celulares se ha determinado el efecto global de la integración del genoma viral de varios subtipos del VPH-AR²².

Estas investigaciones comprueban que la integración del genoma viral es un paso crítico, ya que además de observarse alta inestabilidad cromosómica, se activan genes inducibles por interferones y se estimula la selección de dichas células²². También se determinó que el efecto de la expresión de la proteína E2, en ciertas líneas celulares del cáncer cervico-uterino, induce envejecimiento celular o salida a la fase G0 de su ciclo. Ya se identificaron los efectos de varias líneas celulares del cáncer cervicouterino positivo (VPH+) cuando se anula la expresión del gen E6AP (importante en la degradación de la proteína p53 por E6)²².

JUSTIFICACIÓN

Las detecciones sistemáticas pretenden mejorar el índice de cobertura de la población en riesgo e identificar nuevos factores predisponentes para presentar VPH mediante la realización de cultivos vaginales, colposcopia y con ello implementar medidas de acción preventivas o detección oportuna mediante uso de microarreglos para que de esta manera se realicen nuevos programas de detección oportuna en pacientes de riesgo.

Estar a la vanguardia en métodos diagnósticos es un requisito indispensable para hacer frente a la lucha contra el cáncer cervico-uterino para disponer de herramientas adecuadas en el tratamiento a las mujeres en riesgo. Su diagnóstico temprano y el control de la infección por HPV se han convertido en una necesidad apremiante, sobre todo en países en vías de desarrollo, donde causan mayor número de muertes. En este sentido, el diagnóstico molecular del DNA viral complementa los métodos de tamizaje, como el Papanicolau y la colposcopia.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la identificación del VPH por la técnica de microarreglos en pacientes con imagen colposcópica sugestiva de lesión intraepitelial cervical.

OBJETIVO ESPECÍFICO:

Realizar la genotipificación del VPH por medio de Microarreglos en pacientes con imagen colposcópica sugestiva de lesión intraepitelial cervical.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe una relación en pacientes con imagen colposcópica sugestiva de Lesión intraepitelial cervical y la presencia de genotipos de VPH detectados por microarreglos?

HIPOTESIS

Las pacientes con imagen colposcópica sugestiva de lesión intraepitelial cervical presentarán algún genotipo de VPH detectado por técnicas de microarreglos.

MATERIAL Y MÉTODOS

TIPO DE ESTUDIO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Estudio observacional, retrospectivo.

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

1. Se recurre a los expedientes de pacientes reportadas por la clínica de displasias con imagen sugestiva de VPH, mismas a las que se les realizó toma de muestras para la detección de genotipos de VPH por el procedimiento de microarreglos.
2. Se revisa expediente clínico obteniendo reporte de Papanicolaou, colposcopia, biopsia y de microarreglos para identificación de VPH.
3. Se recaba la información en hoja de captura de datos.
4. Análisis de resultados, discusión y conclusiones.

Metodología para la extracción del ADN de la muestra de Cepillado cervical.

Técnica para extracción DNA (Preparación de la muestra)

1.- Se agrega a la muestra 1.5 ml de solución salina estéril, homogenizar en vortex, centrifugar a 12000RPM (revoluciones por minuto) durante 10 min. Desechar el sobrenadante, teniendo cuidado con el sedimento de no arrastrarlo.

Extracción DNA

2.- Agregar a la muestra obtenida 180 µl de solución de Buffer de lisis de la marca Clart HPV2 con 25 µl de proteinasa K, incubar en el termoblock a 56 °C durante 3 horas o hasta degradación de la muestra. Ajustar el termoblock a temperatura de 70 °C; agregar 200µl de solución B3 al tubo de la muestra e incubar durante 10 min, a 70°C. Trascurrido el tiempo agregar al tubo 210 µl de etanol absoluto y agitar en vortex inmediatamente, transferir a una columna de purificación y centrifugar a 12000 RPM durante 1 min.

3.- Se elimina el filtrado y se vuelve a colocar el filtro en un tubo colector. Agregar 500 µl de solución BW (Solución de lavado). Centrifugar a 12000 RPM durante 1 min. Desechar el filtrado, agregar 600 µl de solución de lavado B5. Centrifugar a 12000RPM durante 1 minuto.

4.- Eliminar el filtrado. Centrifugar a 12000RPM por 1minuto. Previamente precalentar la solución BE (Buffer de Elución a 70°C)

5.- Colocar el filtro en un tubo Eppendorff de 1.5 ml limpio y estéril, se colocan 100 µl de solución BE e incubar por 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar a 12000 RPM por 1 minuto, retirar el tubo de filtro, tapar el tubo Eppendorff, este contiene el DNA. Almacenar a -20 °C.

Técnica de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

- 1.- Colocar 5 µl de muestra de DNA, previamente descongelado, en un tubo para PCR en condiciones estériles. Homogenizar con Vortex.
- 2.- Programar el termociclador como lo indica el fabricante, e iniciar la reacción de amplificación que dura aproximadamente 4 horas. Aquí se obtienen los productos amplificados.

Microarreglos del producto amplificado

- 1.- Desnaturalizar la muestra del amplificado obtenido del PCR a 95°C durante 10 minutos en el termociclador.
- 2.- Preparar solución TL diluida. Para 24 muestras se diluyen 3 ml de solución TL con 27 ml de agua destilada.

Prelavado del tubo AT

- 1.- A cada tubo AT (tubo de microarreglo) se le agregan 300 µl de solución TL diluida, mezclar en ángulo de 180° suavemente.
- 2.- Retirar la solución TL diluida.

Hibridación

- 1.- Agregar 100 µl de solución de hibridación en cada tubo AT y adicionar 5 µl de la muestra del producto amplificado del PCR desnaturalizado, homogenizar con la muestra, e incubar en un termoblock a temperatura de 55 °C durante 1 hora.
- 2.- Retirar la solución de hibridación. Adicionar 300 µl de solución TL diluida. Lavar el tubo del microarreglo. Retirar la solución de TL diluida.
- 3.- Agregar 100 µl conjugado diluido que se preparo previamente de la siguiente manera: para una muestra 1µl de conjugado + 100 µl de solución DC).
- 4.- Incubar a 30 °C durante 15 min
- 5.- Retirar la solución de conjugado diluido. Lavar con 300µl solución de TL diluida el tubo de microarreglo. Agregar 100µl de solución reveladora. Incubar a 25 °C durante 10 minutos.
- 6.- Analizar el Microarreglo en el equipo de Genómica.

UNIVERSO O POBLACIÓN

Pacientes con diagnóstico colposcópico de VPH y reporte de microarreglos realizado en el Hospital Juárez de México en el periodo de enero 2011 a septiembre 2012.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Pacientes con imagen colposcópica sugestiva de VPH, que cuenten en el expediente con reporte de Papanicolaou, biopsia y microarreglos.

CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN

1. Pacientes con diagnóstico previo de neoplasia cervical.
2. Pacientes con tratamientos previos por VPH.
3. Pacientes que no se haya obtenido el suficiente material para los procedimientos planteados.
4. Pacientes con antecedente de histerectomía.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- 1.-Pacientes que no cuenten con expediente clínico completo.
- 2.-Pacientes que no cuenten con reporte citológico, histopatológico o de microarreglos.

VARIABLES

- ❖ **COLPOSCOPIA:** Procedimiento exploratorio instrumentado, en el que se emplea un aparato con sistema óptico, de aumento, a través del cual se puede observar la vulva, vagina y cuello uterino, observándose en este último las condiciones de su epitelio, al cual se le pueden realizar tinciones de orientación diagnóstica.
- ❖ **VPH:** Es un virus pequeño con un genoma de ADN circular, de doble cadena de aproximadamente 8,000 pares de bases de longitud, y una cápside

proteínica icosaédrica. Su genoma contiene de 9 a 10 regiones codificantes involucradas en la regulación de las funciones virales y las proteínas estructurales implicadas en la producción de partículas.

DESCRIPCIÓN OPERATIVA DEL ESTUDIO

Se realizó una investigación a partir de la recopilación de un banco de datos de pacientes con imagen colposcópica sugestiva de VPH y toma de muestras para la identificación de genotipos por el método de microarreglos mediante los criterios de inclusión previamente mencionados.

Se realizó revisión del expediente clínico de cada paciente y se obtiene la información relevante.

Se identifica imagen sugestiva por colposcopia de VPH y se corrobora con el reporte de microarreglos.

CALCULO DE LA MUESTRA

Pacientes con diagnóstico de lesión intraepitelial cervical durante el año de estudio donde se recopilaron 87 pacientes.

METODO ESTADISTICO

Ji cuadrada (prueba no paramétrica)

METODO DE RECOLECCION DE DATOS

- ❖ Expediente clínico
- ❖ Hoja de recolección de datos

HOJA DE CAPTURA DE DATOS



**TECNICA DE MICROARREGLOS PARA LA DETECCION DE
VPH EN PACIENTES CON DIAGNOSTICO COLPO-
HISTOLOGICO DE LESION INTRAEPITELIAL CERVICAL EN
EL HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO**

Nombre: _____ Edad: _____ No. De expediente: _____

Antecedentes patológicos: Oncológicos y/o de tracto reproductor inferior:

Antecedentes personales no patológicos:

Tabaquismo _____ Tiempo y frecuencia _____

Antecedentes Gineco-obstétricos:

FUM _____ IVSA _____ PS _____ G _____ P _____

MPF actual: _____

Padecimiento actual referido por citología:

Leucorrea: SI: _____ NO: _____

Papanicolaou, Dx: _____

Dx colposcópico:

LIEBG: _____ LIEAG: _____ Ca Microinvasor: _____

Dx Biopsia: _____

Reporte de Microarreglos: _____

Responsables del Llenado de este formato:

Dra. Fabiola Fragoso Sandoval MBGO

Dr. Francisco Javier Hernández Aldana MJSGO

QBP. Elvia García Jiménez

QBP. María Irma Chávez Zúñiga

Dra. Martha Patricia Rico Aco.

RIESGO DE LA INVESTIGACIÓN:

Riesgo Mínimo

RECURSOS HUMANOS

Personal administrativo asignado al archivo clínico

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Elaboración del Protocolo:	Abril - Mayo 2012
Registro y captación de pacientes	Enero 2011 - Septiembre 2012
Captación de información	Septiembre 2012
Elaboración de estadísticos y gráficas	Octubre 2013
Análisis de resultados	Noviembre 2013 – Mayo 2014
Discusión de resultados y conclusiones	Junio – Agosto 2014
Entrega de informe final por escrito	Septiembre – Noviembre 2014

RESULTADOS

Se estudiaron 87 pacientes, de la clínica de displasias del Hospital Juárez de México, que cumplieron con los criterios de inclusión del estudio; estas, con un rango de edad de 15-68 años, obtuvimos los siguientes resultados: Una media de 37.6 años distribuyéndose como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Relación de la Edad de las pacientes estudiadas.

Edad	Total de pacientes (%)
15 a 25 años	13 pacientes (14.9%)
26 a 45 años	49 pacientes (56.3%)
46 a 68 años	25 pacientes (28.7%)

Con respecto al número de gestaciones, mostramos los datos obtenidos en la tabla 2.

Tabla 2. Relación de número de embarazos de las pacientes estudiadas

Número de embarazos	Pacientes (%)
Nuligestas	14 pacientes (16.1%)
1-3 gestas	28 pacientes (32.2%)
4-5 gestas	37 pacientes (42.5%)
6 y mas gestas	8 pacientes (9.2%)

Consumo de tabaco: De las 87 pacientes, detectamos que 44 de ellas (50.6%) resultaron ser fumadoras y las 43 restantes (49.4%) no fumadoras. Los datos se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Relación con el Tabaquismo

Tabaquismo	Pacientes (%)
Positivo	44 pacientes (50.6%)
Negativo	43 pacientes (49.4%)

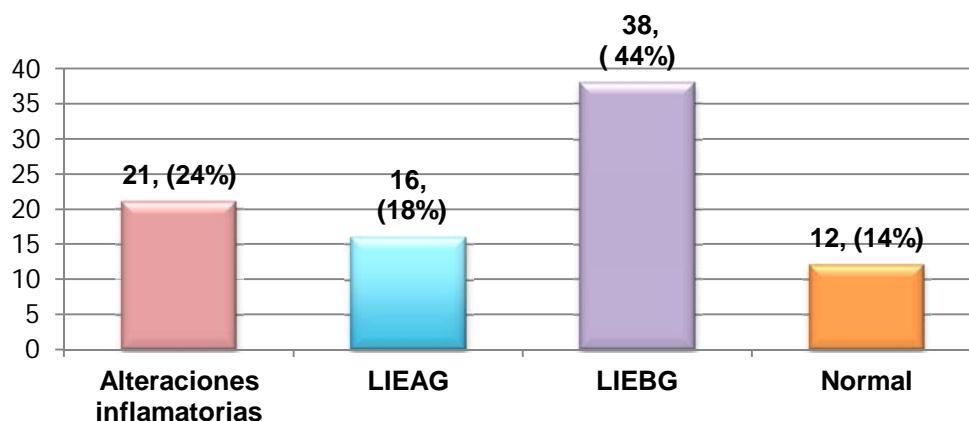
Los métodos de planificación que refirieron haber utilizado las pacientes en nuestro estudio se muestran en la tabla 4

Tabla 4. Relación con el uso de métodos de planificación

Método de planificación	Pacientes (%)
DIU	10 (11.5%)
Hormonales	5 (5.7%)
OTB	18 (20.7%)
Preservativo	21 (24.1%)
Ningún método	33 (37.9%)

Los resultados obtenidos de las 87 pacientes estudiadas con respecto a la citología cervicovaginal se muestran en la gráfica 1.

Gráfica 1. Frecuencia del estado histopatológico de la citología Cervicovaginal



A las pacientes estudiadas se les realizó colposcopia en la unidad de displasias, se describen los resultados en la tabla 5.

Tabla 5. Reporte colposcópico

Colposcopia	Pacientes (%)
LIEAG	21 pacientes (24.1%)
LIEBG	63 pacientes (72.4%)
Ca Microinvasor	3 pacientes (3.4%)

Con el resultado histopatológico de la biopsia cervical se reportó que de las 87 pacientes estudiadas; 77 fueron positivas a infección de VPH con una frecuencia del 88.5% y el resto fueron reportadas negativas a VPH con una frecuencia del 11.5%, de las cuales el reporte de biopsia nos muestra los grados de alteración presentes a nivel celular como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Estudio histopatológico de biopsia de las pacientes

Reporte de biopsia	Pacientes (%)
LIEBG	58 (66.7%)
LIEAG	15 (17.2%)
Cervicitis	10 (11.5%)
Ca. Microinvasor	4 (4.6%)

Al realizar la genotipificación del VPH por microarreglos de las pacientes en estudio, se encontró que 80 fueron positivas a VPH y las 7 restantes; negativas. Mostramos la frecuencia de manera general con la que se presentaron las infecciones por VPH-AR, VPH-BR y coinfecciones en la tabla 7.

Tabla 7. Frecuencia de genotipos VPH Alto, Bajo riesgo y coinfección.

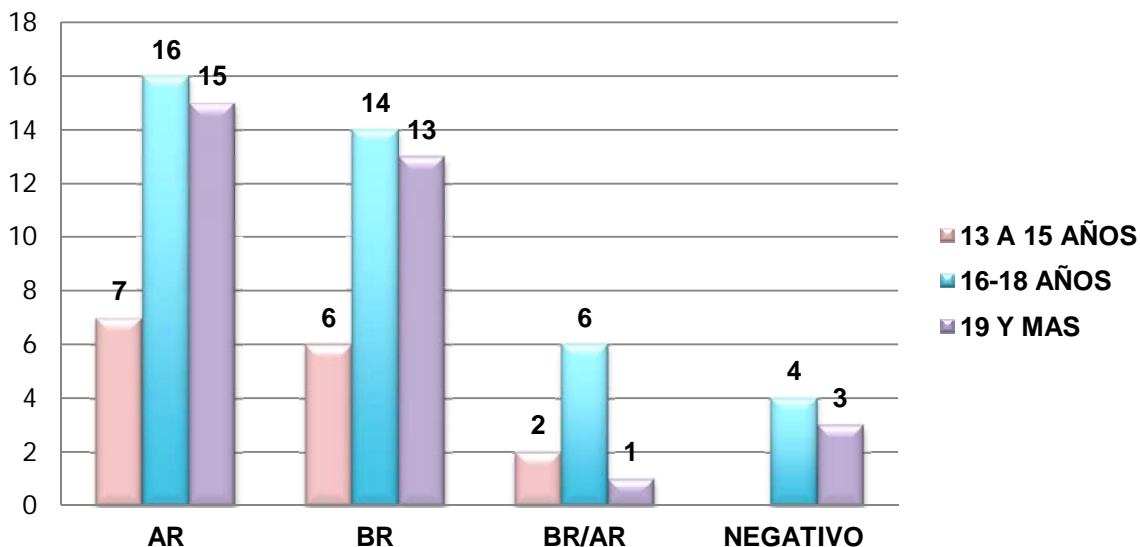
Genotipo VPH	Pacientes en estudio	Frecuencia (%)
AR	38 pacientes	(43.7%)
BR	33 pacientes	(37.9%)
AR/BR	9 pacientes	(10.3%)
Negativo	7 pacientes	(8.0%)

El rango de edad entre las pacientes estudiadas fue de 15 a 68 años con una media de 37.6 años, de las cuales el 17.2%, refirieron haber iniciado vida sexual activa entre los 13-15 años, el 46% entre los 16-18 años y el 36.8% restante a los 19 y más años. Si analizamos la relación que presenta la edad y el inicio de vida sexual activa, observamos que en las pacientes con infección por VPH la edad media de inicio de relaciones sexuales es menor (21.5 años) que en las pacientes sin infección por VPH (29.4 años).

La edad media de inicio de relaciones sexuales en pacientes positivas para VPH-AR, fue de 19.8 años, muy similar a las pacientes con infección por genotipos de VPH-BR, que es de 20.5 años, mientras que las pacientes con coinfección por múltiples genotipos de VPH mostraron una edad media de inicio de relaciones

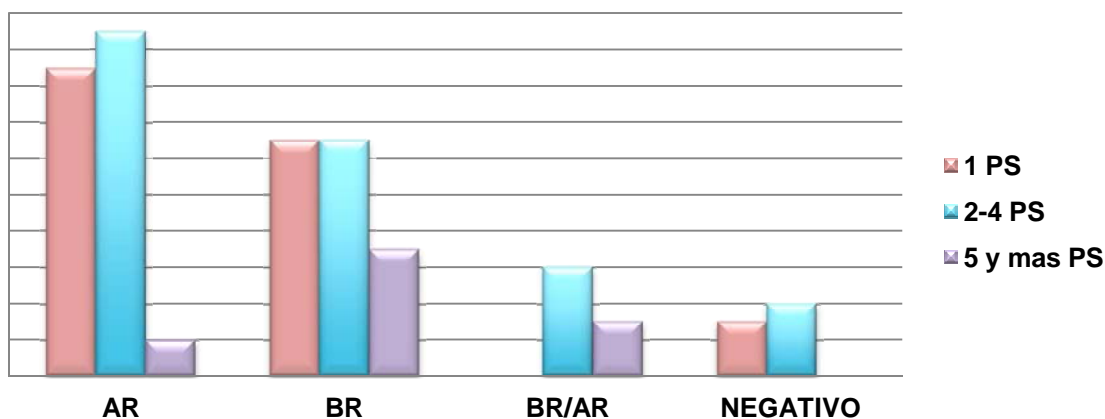
sexuales de 29.6 años, y en pacientes negativas fue de 30.4 años, como se observa en la gráfica 2.

Gráfica 2. Inicio de vida sexual activa y tipificación viral



El número de parejas sexuales referido por las pacientes estudiadas fue de 1 a 9 parejas, con una media de 2.5, de las cuales el 37.8% refirió haber tenido 1 sola pareja, el 48.3% de 2 a 4 parejas y el resto de la población 13.8% 5 y más parejas como se presenta en el gráfica 3.

Gráfica 3. Número de parejas sexuales y tipificación viral

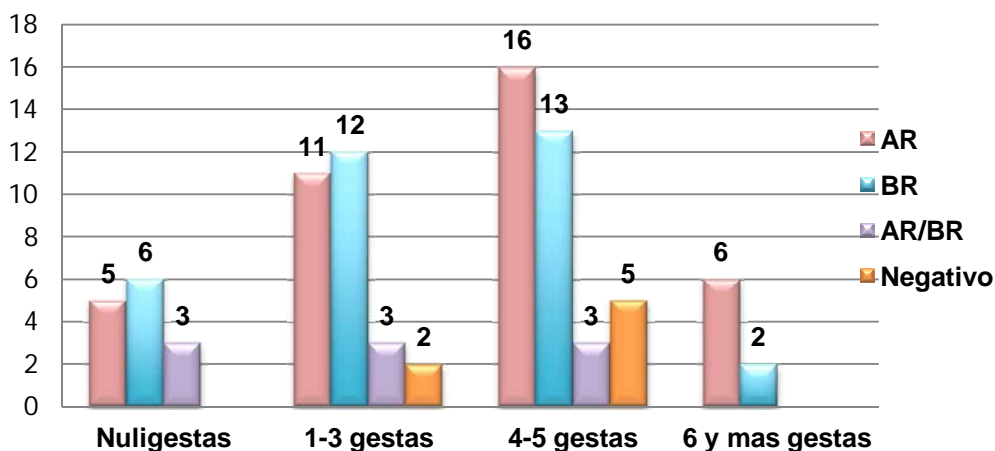


En las pacientes con infección por VPH, la media de parejas sexuales es de 2.7 y para las pacientes sin infección por VPH es de 1.8. De esta manera destacamos que aunque la relación de estas variables no tenga diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) podemos recalcar que las pacientes positivas para infección

de VPH tienen una media mayor de parejas sexuales que las pacientes no infectadas con VPH.

La paridad media en general en nuestras pacientes fue de 2.5 gestas. Las pacientes con infección por VPH tienen una media de gestas de 3.2, comparado con las pacientes sin infección por VPH que fue de 2.1 gestas. El 16.1% de las pacientes nuligestas tuvieron IVPH frente a un 83.9% de la pacientes quienes tuvieron 1 o más gestas. Obtuvimos un total de 38 pacientes (43.6%), con detección de infección por VPH-AR con una media de 3.6 gestas; 33 pacientes en quienes se detectó infección por VPH-BR con una media de 2.5 gestas, 9 pacientes (10.3%) con coinfección con genotipos múltiples y paridad media de 1.7 gestas; y solo 7 pacientes (8.0%) en quienes no se identificó ningún genotipos de VPH con 1.1 gestas como paridad media, como lo especificamos en la siguiente gráfica 4.

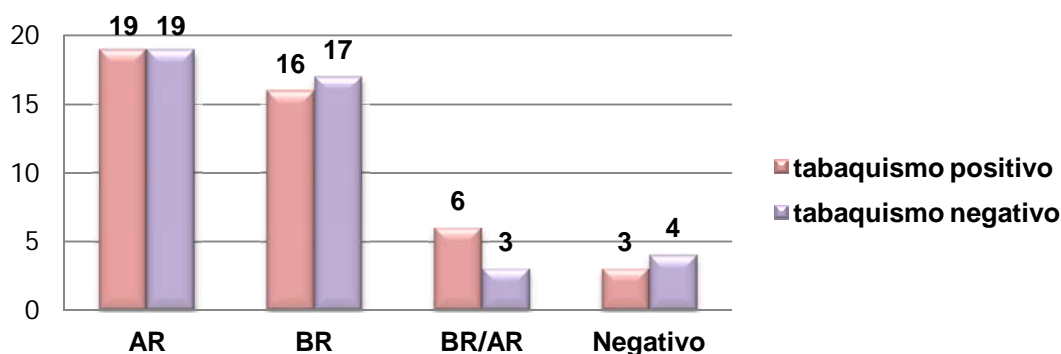
Gráfica 4. Número de embarazos y tipificación viral



En relación al tabaquismo y presencia de infección por VPH observamos que el número de pacientes es muy similar entre las pacientes con tabaquismo positivo como con tabaquismo negativo, existiendo una ligera inclinación de afección hacia las pacientes con habito tabáquico positivo.

Observamos datos muy similares entre pacientes con tabaquismo positivo como negativo; con el número de pacientes con VPH-AR se presentó en igual número de casos, 19 pacientes (21.8%) en ambos grupos, los VPH-BR mostraron ligera prevalencia en pacientes no fumadoras en 17 casos (19.5%) con respecto a las pacientes fumadoras 16 casos (18.3%), para el caso de coinfección, la prevalencia se encuentra en las pacientes fumadoras con 6 casos (6.8%), respecto a 3 casos (3.4%) en pacientes no fumadoras; y finalmente 7 pacientes negativas a infección por VPH, 4 de ellas (4.5%) en mujeres no fumadoras y las 3 restantes (3.4%) en fumadoras como se muestra en la gráfica 5.

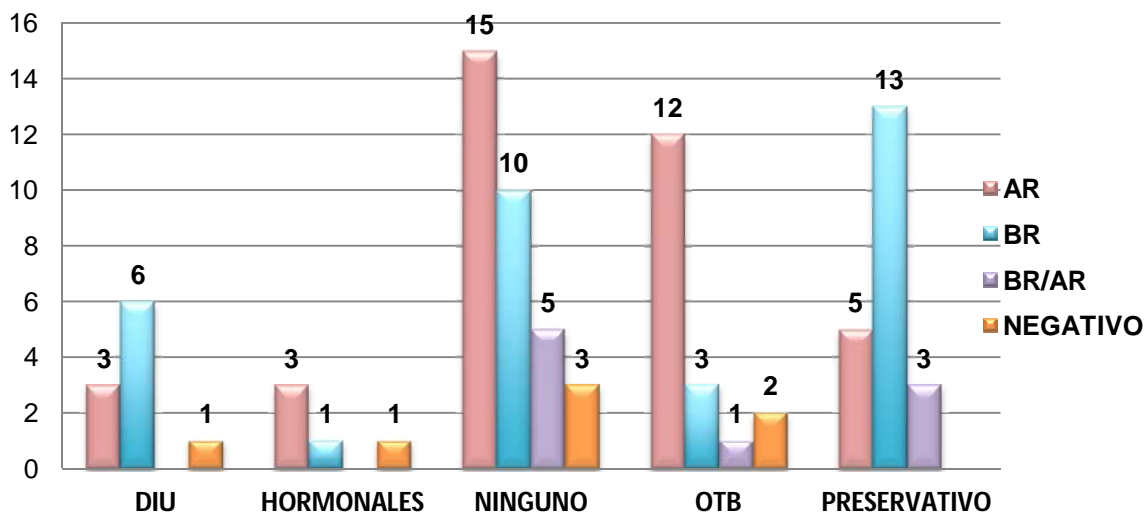
Gráfica 5. Tabaquismo y relación con infección por VPH



La relación que existe entre el uso de métodos de planificación y la infección por VPH la observamos de manera general con la identificación de genotipos únicos, con respecto a los genotipos mixtos, con prevalencia notoria de VPH-AR en 38 casos (43.6%) seguido por VPH-BR en 33 casos (37.9%), para los genotipos múltiples BR/AR se identificaron 9 casos (10.3%) y solo 7 casos (8.0%) negativos a VPH.

Con respecto al uso de métodos de planificación observamos que entre las pacientes quienes no refirieron uso de algún método, visto en 33 casos (37.9%) se tiene el mayor número de infección por VPH y dentro de estos presentándose los genotipos VPH-AR. En pacientes con uso de preservativo en 21 casos (24.1%) prevalecieron los genotipos VPH-BR, las pacientes con método definitivo: OTB en 18 casos (20.6%) se vieron mayormente afectadas con VPH-AR, pacientes con uso de DIU en 10 casos (11.4%) se identificaron genotipos de VPH-BR, y finalmente 5 pacientes (5.7%) quienes refirieron uso de hormonales se identificaron genotipos de VPH-AR; estos datos se muestran en la gráfica 6.

Gráfica 6. Métodos de planificación familiar y tipificación viral



Con el análisis de ambas variables, observamos que las pacientes quienes no utilizan ningún método de planificación se vieron más afectadas por VPH; dentro de esta infección los genotipos que se identificaron en su gran mayoría fueron los VPH-AR.

En nuestras pacientes estudiadas, los genotipos de VPH más frecuentes fueron, por orden de prevalencia, el VPH 11 (12 casos equivalentes a 13.7%), VPH 16 (11 casos con el 12.6%), VPH 6 (10 casos con el 11.4%), y VPH 18 (8 casos, representando el 9.1%). En la tabla 8 y 9 se muestran por orden de mayor a menor prevalencia todos los genotipos encontrados en nuestra población de estudio.

Tabla 8. Prevalencia de genotipos de VPH identificados

Genotipo de VPH	Número de pacientes (%)
VPH 11	12 (13.7%)
VPH 16	11 (12.6 %)
VPH 6	10 (11.4 %)
VPH 18	8 (9.1 %)
VPH 31	7 (8.0 %)
VPH 42	4 (4.5 %)
VPH 59	3 (3.4 %)
VPH 33	2 (2.2 %)
VPH 51	2 (2.2 %)
VPH 58	2 (2.2 %)
VPH 61	2 (2.2 %)
VPH 62	2 (2.2 %)
VPH 52	1 (1.1 %)
VPH 56	1 (1.1 %)
VPH 70	1 (1.1 %)
VPH 44	1 (1.1 %)
VPH 54	1 (1.1 %)
VPH 81	1 (1.1 %)

Tabla 9. Prevalencia de genotipos Alto y Bajo riesgo de VPH

Genotipos VPH-AR, Número de casos (%)		Genotipos VPH-BR, Número de casos (%)	
VPH 16	11 pacientes (12.6%)	VPH 11	12 pacientes (13.7%)
VPH 18	8 pacientes (9.1%)	VPH 6	10 pacientes (11.4%)
VPH 31	7 pacientes (8.0%)	VPH 42	4 pacientes (4.5%)
VPH 59	3 pacientes (5.7%)	VPH 61	2 paciente (2.2%)
VPH 51	2 pacientes (2.2%)	VPH 62	2 paciente (2.2%)
VPH 58	2 pacientes (2.2%)	VPH 44	1 paciente (1.1%)
VPH 33	2 pacientes (2.2%)	VPH 54	1 paciente (1.1%)
VPH 52	1 paciente (1.1%)	VPH 81	1 paciente (1.1%)
VPH 56	1 paciente (1.1%)		
VPH 70	1 paciente (1.1%)		

Como lo muestran las tablas anteriores, los genotipos que prevalecieron en nuestro estudio son los de AR en un 43.6%, sobresaliendo entre estos los genotipos 16 (12.6%), 18 (9.1%) y 31 (8.0%); mientras que los genotipos de BR ocuparon el 37.9%, destacando entre estos los genotipos 6 (11.4%), 11 (13.7%) y 42 (4.5%).

Obtuvimos solo un 10.3%, equivalentes a 9 pacientes en quien se identificaron coinfecciones, y de estas la más frecuente fue la asociación de VPH 11/18 en 2 casos (2.2%) como se muestra en la tabla 9.1.

Tabla 9.1. Coinfección por genotipos de VPH, Alto y Bajo riesgo

Coinfección por genotipos de VPH AR / BR, número de casos (%)	
VPH 11 / 18	2 pacientes (2.2%)
VPH 42 / 16 / 54	1 paciente (1.1%)
VPH 6 / 31 / 59	1 paciente (1.1%)
VPH 11 / 52	1 pacientes (1.1%)
VPH 16 / 52 / 58 / 6 11	1 pacientes (1.1%)
VPH 62 / 59	1 pacientes (1.1%)
VPH 61 / 53	1 paciente (1.1%)
VPH 6 / 51 / 58	1 paciente (1.1%)

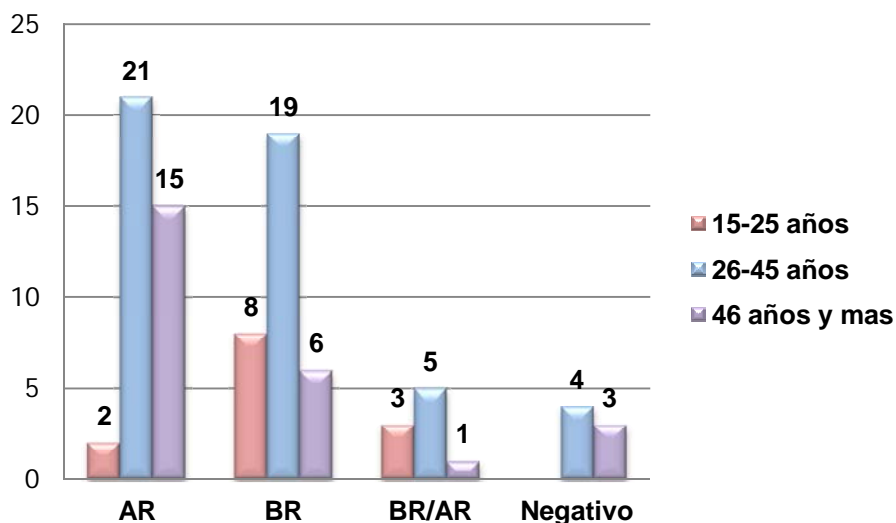
De manera general, observamos una edad media en las pacientes positivas para IVPH de 21.7 años mientras que en las pacientes negativas es de 31.7 años.

En el grupo de 15 a 25 años, con edad promedio de 17.8 años, existe prevalencia para VPH-BR, identificándose 8 casos (9.1%), 2 casos para VPH-AR (2.2%), y para coinfecciones 3 casos (3.3%), con un total de 13 pacientes analizadas en este grupo.

El grupo de edad mayor afectado fue de 26 a 45 años; con edad promedio de 34.3 años, en el que prevalecieron los genotipos VPH-AR en 21 casos (24.1%), continuando con VPH-BR en 19 casos (21.8%), infección mixta VPH BR/AR en 5 casos (5.7%), y 4 casos (4.5%) reportados como negativos a VPH, con un total de 49 pacientes dentro de este grupo de edad.

En el grupo de 46 y más años, con edad promedio de 49.4 años: se presentan 15 casos (17.2%) identificados con genotipos VPH-AR; 6 pacientes (6.8%) infectadas con genotipos VPH-BR, 1 caso (1.1%) con VPH BR/AR y 3 casos negativos (3.4%) con una total de 25 pacientes estudiadas en este grupo como se observa en la gráfica 7.

Gráfica 7. Genotipo de VPH según edad



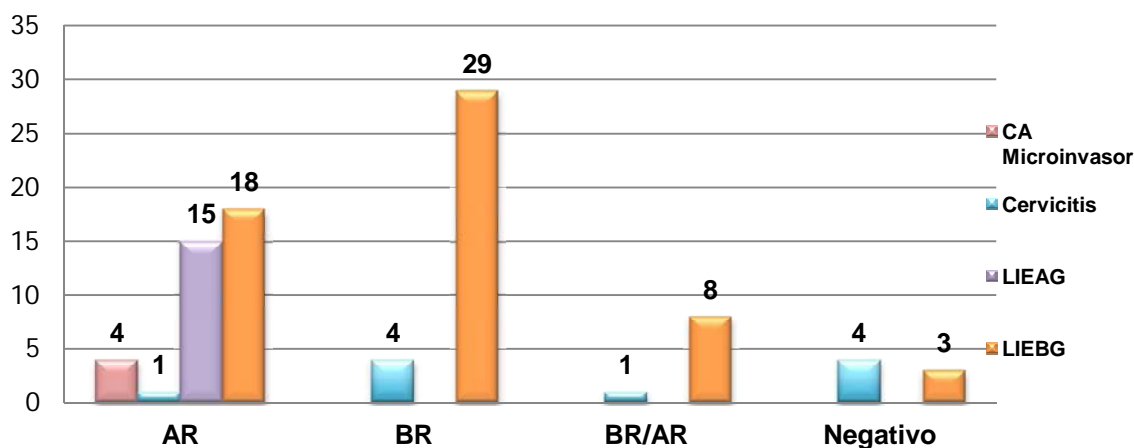
De acuerdo con el reporte de biopsia de las pacientes estudiadas, se identificaron 58 casos con LIEBG y en la genotipificación obtuvimos en la mayoría de los casos genotipos VPH-AR con un 73%.

En el caso de Ca microinvasor, detectado en 4 casos se observo la presencia de VPH-AR.

En las de LIEAG, 15 pacientes presentaron genotipos de VPH-AR, 29 casos equivalentes al 50% de este subgrupo de estudio con VPH-BR.

Los resultados anteriores hablan de la alta sensibilidad y especificidad que de la técnica de microarreglos para la detección e identificación de los diferentes genotipos de VPH como lo muestra la siguiente gráfica 8.

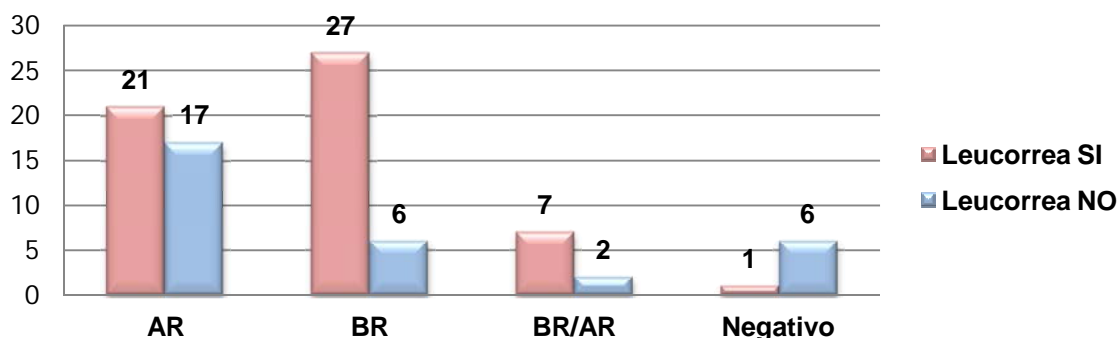
Gráfica 8. Reporte histopatológico de la biopsia con respecto al método de microarreglos para detección de VPH.



Para realizar nuestro análisis, dividimos a la población en dos grupos: pacientes quienes presentaban leucorrea y quienes no la presentaban al momento del estudio. De esta manera observamos que un grupo de 56 pacientes (64.3%), presentaban leucorrea; 27 de ellas (48.2%), se relacionaron con infección por VPH-BR, 21 pacientes (37.5%) se identificaron genotipos VPH-AR, 7 pacientes (10.7%) con coinfecciones VPH BR/AR, y solo 1 paciente (1.7%) no asociada a IVPH. Por otra parte, 31 pacientes quienes no presentaron leucorrea al momento del estudio (35.6%), se asociaron a VPH-AR en 17 casos (54.8%), seguido de VPH-BR en 6 casos (19.3%), 2 pacientes (6.4%) relacionada con coinfecciones VPH BR/AR y 6 pacientes (19.3%) no asociadas a IVPH.

De esta manera observamos que la presencia de infección por VPH se ve favorecida sin lugar a dudas en pacientes con leucorrea como lo refleja la siguiente gráfica 9.

Gráfica 9. Relación de leucorrea y presencia de infección por VPH

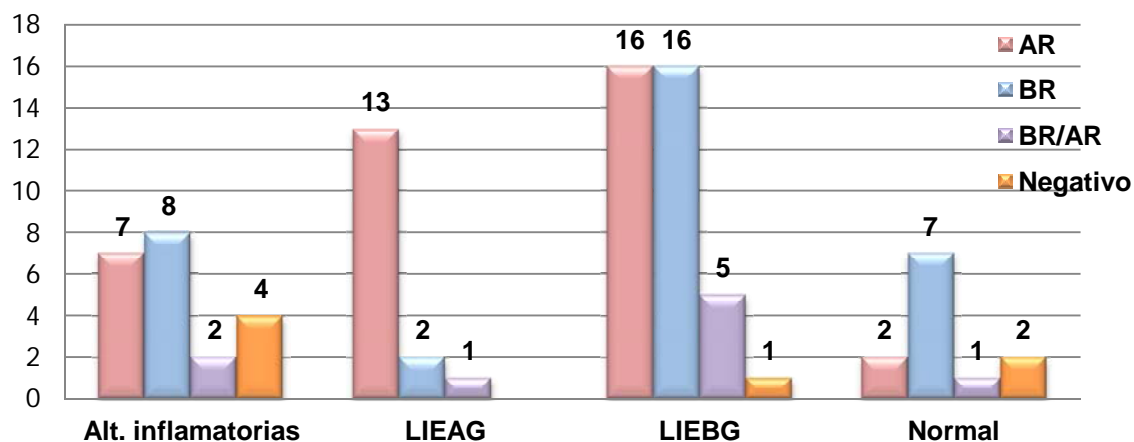


Al correlacionar los diagnóstico obtenidos por la técnica de microarreglos y Papanicolaou, observamos que los genotipos VPH-AR prevalecen, detectados en 38 pacientes (43.6%), de los que 13 casos fueron identificados por Papanicolaou

con LIEAG; en los genotipos de VPH-BR se encontraron en 33 pacientes (37.9%), mientras que en estos casos se observó con LIEBG en 16 casos detectados por Papanicolaou; en los casos de coinfección por VPH se observaron 9 casos (10.3%) con reporte de Pap de LIEBG de 5 pacientes.

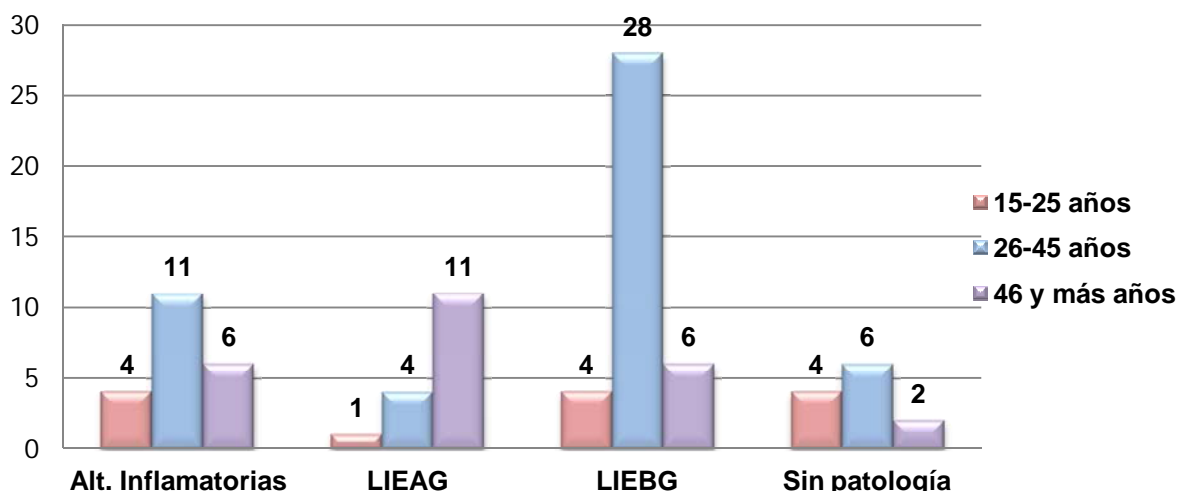
Tuvimos 7 pacientes con resultados negativos con el 8.0%, de los cuales en 4 casos se reportaron alteraciones inflamatorias, 2 casos con epitelio normal y solo 1 caso asociado con LIEBG, como se observan en la Gráfica 10.

Gráfico 10. Reporte de Papanicolaou asociado al método de microarreglos



La edad y la correlación con el reporte de Papanicolaou, se muestran en la gráfica 11.

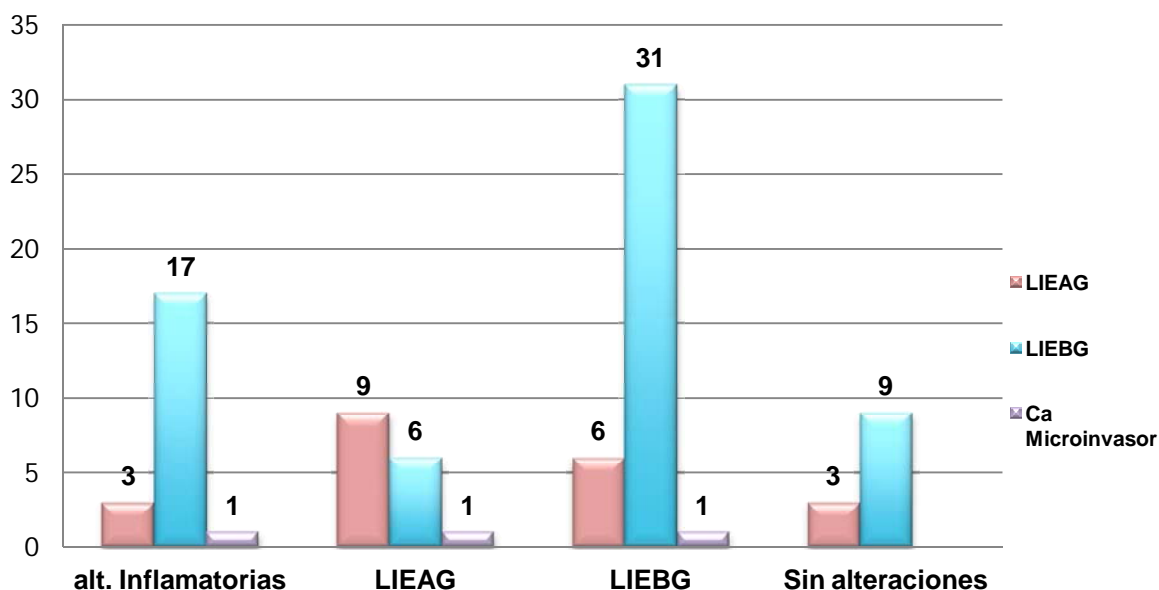
Gráfica 11. Grupos de edad y reporte de Papanicolaou



Con respecto al reporte de Papanicolaou, obtuvimos los siguientes resultados: 21 casos con Alteraciones inflamatorias, 16 con LIEAG, 38 pacientes con LIEBG y 12 sin patología.

Los resultados que obtuvimos al correlacionar diagnósticos colposcópicos y de Papanicolaou, se observan en la gráfica 12.

Gráfica 12. Relación entre reporte de Papanicolaou y colposcopia



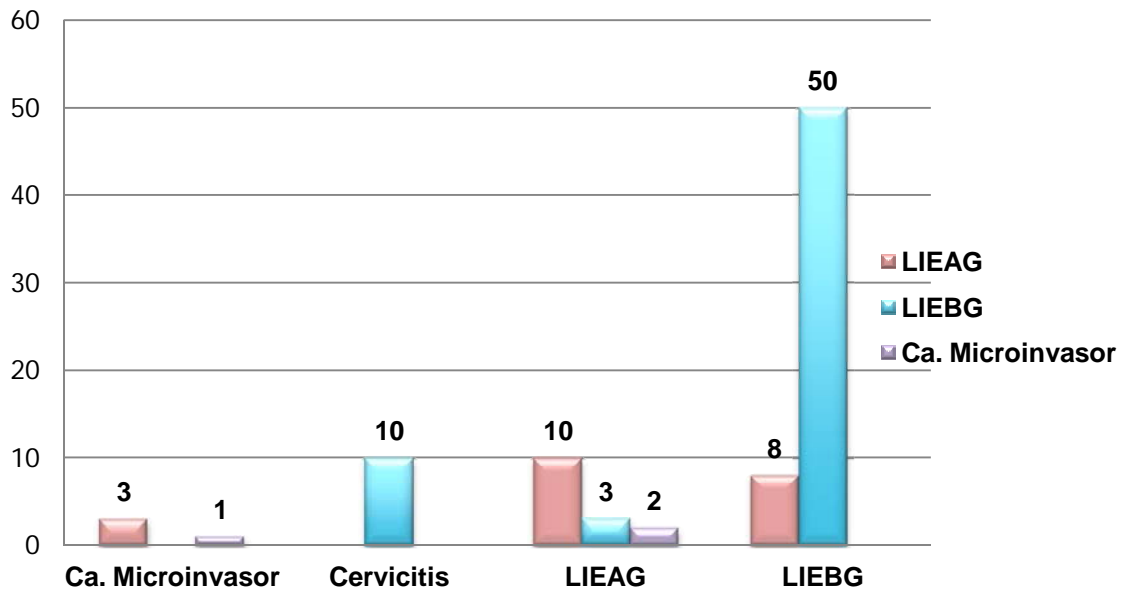
Llama la atención que la imagen colposcópica sugestiva de Ca microinvasor detectada en 3 pacientes (3.4%) no tuvo relación con el reportado de Papanicolaou, ya que se presentó en relación a alteraciones inflamatorias, LIEAG y LIEBG, con reporte de una paciente para cada caso mencionado en 1.1%. Tomemos en cuenta que la sensibilidad y especificidad de ambas técnicas diagnósticas depende mucho de la experiencia del analista y suele existir discrepancia entre la interpretación de los diagnósticos arrojados por ambas técnicas, pudiendo de esta manera subestimar una lesión premaligna.

Por reporte colposcópico se detectan 63 casos (72.4%), de estos 50 casos con LIEBG, 10 casos a cervicitis y 3 casos relacionados con LIEAG, con mayor prevalencia los de bajo grado LIEBG todos estos reportados por biopsia.

Las LIEAG se detectaron en segundo lugar de frecuencia, teniendo un total de 21 casos (24.1%) y de ellas por biopsia se reportaron 10 casos asociadas a LIEAG, 8 casos para LIEBG y 3 casos de Ca microinvasor.

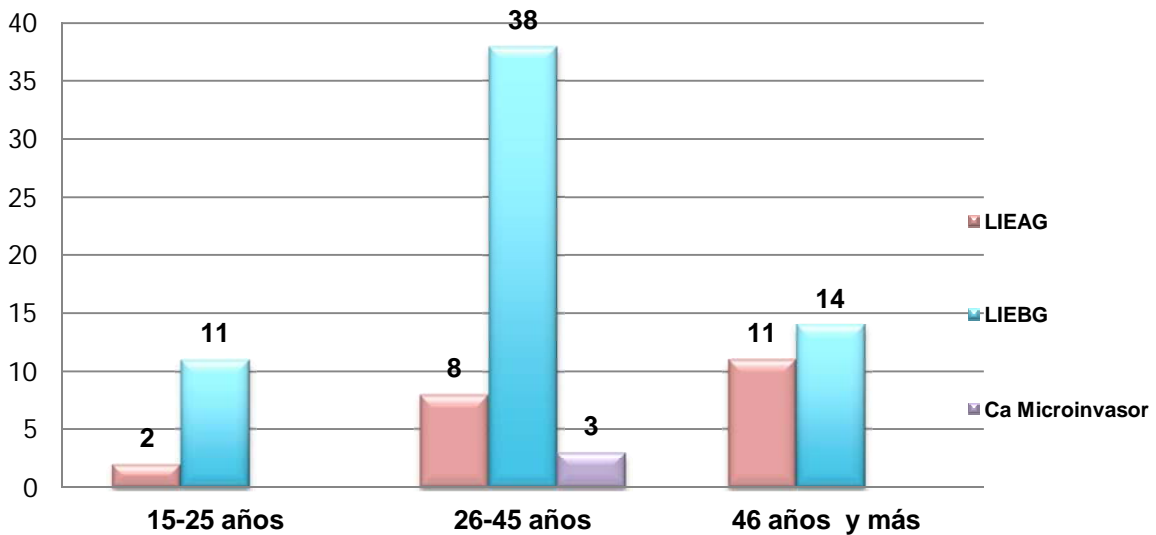
Se observaron por imagen colposcópica 3 casos de Ca microinvasor (3.4%), dos de estos relacionados con LIEAG y 1 caso con el mismo diagnóstico corroborado por biopsia como se observa en la gráfica 13.

Gráfica 13. Relación de reporte de colposcopia y biopsia



La prevalencia de lesiones cervicales reportadas por colposcopia, representándose en la gráfica 14.

Gráfica 14. Reporte colposcópico y prevalencia según la edad



De acuerdo con los resultados histopatológicos en las muestras de biopsia cervical de nuestras pacientes, las LIEBG son las que se presentan en la mayoría de los casos, teniendo 58 pacientes afectadas (66.6%), con una edad media de 22.7 años y distribuyéndose como se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Prevalencia de LIEBG según el grupo de edad

Edad	LIEBG: número de casos (%)
15-25 años:	10 casos (11.4%)
26-45 años	39 casos (66.6%)
46 y más años	9 casos (10.3%)

En segundo lugar de frecuencia se presentan las LIEAG, en 15 casos, equivalentes a 17.2% de nuestra población, con una edad media de 28.5 años, y distribuyéndose de la siguiente manera en la tabla 11.

Tabla 11. Prevalencia de LIEAG según el grupo de edad

Edad	LIEAG: número de casos (%)
15-25 años:	1 casos (1.1%)
26-45 años	7 casos (8.0%)
46 y más años	7 casos (8.0%)

Detectamos 10 casos de cervicitis, equivalente a 11.4% de la población total, teniendo como edad media 46.3 años de edad, y distribuyéndose de la siguiente manera:

Tabla 12. Prevalencia de cervicitis según el grupo de edad

Edad	Cervicitis: número de casos (%)
15-25 años:	2 casos (2.2%)
26-45 años	2 casos (2.2%)
46 y más años	6 casos (6.8%)

Y finalmente la detección de Ca microinvasor en 4 casos, equivalente a 4.5% de la población y detectada en los siguientes grupos etéreos; teniendo como edad media de afección 46.5 años y observando su distribución en la siguiente tabla:

Tabla 13: Prevalencia de Ca microinvasor según el grupo de edad

Edad	Ca microinvasor: número de casos (%)
26-45 años	1 casos (1.1%)
46 y más años	3 casos (3.3%)

Observamos que la prevalencia por toma de biopsia fue para las LIEBG, y se presentaron con mayor frecuencia entre 26-45 años de edad, en contraparte la presencia de Ca microinvasor, fue la menor de las prevalencias y afectó al grupo de mayor edad de 46 y más años.

Relación entre edad y tipo de lesión colposcópica asociada a los diferentes genotipos de VPH

Haciendo un análisis y correlación de estas variables, obtenemos los siguientes datos:

Analizamos un total de 13 pacientes en el rango de edad de 15-25 años, observando por colposcopia 11 casos con LIEBG (84.6%), y solo 2 casos con LIEAG (15.3%). Por microarreglos 8 casos asociados con VPH-BR (61.3%), 2 casos para VPH-AR (15.3%) y 3 casos de coinfecciones con VPH BR/AR (23%). En este grupo de pacientes la imagen colposcópica y los microarreglos detectaron VPH-BR y LIEBG en la mayoría de los casos.

Estudiamos 49 pacientes de 26-45 años: detectando por imagen colposcópica LIEBG en 38 casos (77.5%), 8 casos relacionados con LIEAG (16.3%), y 3 imágenes sugestiva de Ca microinvasor (6.1%). Al relacionarlo con los diferentes genotipos de VPH, observamos en 21 casos la relación con VPH-AR (42.8%), 19 casos para VPH-BR (38.7%), coinfecciones con genotipos mixtos VPH BR/AR 5 pacientes (10.2%) y sin identificarse genotipos de VPH 4 casos (8.1%).

En este grupo de pacientes detectamos en su mayoría por imagen colposcópica LIEBG, y por microarreglos VPH-AR con una discreta prevalencia sobre VPH-BR, sin embargo, lo realmente relevante es que los casos detectados como Ca microinvasor por colposcopia, se relacionaron en el 100% de los casos con genotipos VPH-AR.

Estudiamos 25 pacientes de 46 y más años; observamos que por imagen colposcópica se detectan LIEAG en 11 pacientes (44%), y LIEBG en 14 pacientes (56%). Por microarreglos encontramos 15 casos detectados de VPH-AR (60%), 6 casos par VPH-BR (24%), 1 caso con coinfecciones, genotipos VPH-BR/AR (4%) y 3 casos negativos a VPH (12%).

Por colposcopia se detectaron en su mayoría LIEAG y por microarreglos genotipos VPH- AR.

Todo lo anteriormente reportado representa gran similitud con lo encontrado en la literatura, lo presentado en la edad de 15-25 años con LIEBG, correspondientes a infecciones transitorias.

Para los 26-45 años donde se detectaron 3 casos de Ca microinvasor se reporta un pico de prevalencia de Ca a los 45 años aproximadamente tomando en cuenta el comportamiento sexual y el número de parejas sexuales siendo en nuestra población el grupo sexualmente más activo.

Para el grupo de 46 y más años en quienes se detectaron LIEAG pudiendo correlacionar el tipo de lesión encontrada con el número de gestas que refirieron estas pacientes; ya que son multíparas, además el número de compañeros sexuales y sobre todo un dato importante que en este estudio no se tuvo información acerca de antecedentes de infección por VPH.

DISCUSIÓN

En nuestro estudio los genotipos de AR se presentaron con una frecuencia del 43.6%, dentro de estos, los genotipos 16 y 18 representaron el 12.6% y 9.1%, respectivamente; seguidos por el genotipo 31, que se presentó en un 8.0% mientras que los genotipos de BR ocuparon solo el 37.9%, destacando entre estos los genotipos 11 y 6, representando un 13.7% y 11.4% respectivamente; seguido del genotipo 42 en 4.5%, por mencionar los más importantes.

Como los estudios descritos en la literatura internacional, nuestros resultados obtenidos se sustentan con lo mencionado en el estudio más extenso realizado sobre VPH, "GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence; worldwide in 2012" revelando la prevalencia de VPH a nivel mundial, de los genotipos 16 y 18 por sobre todos los demás⁴.

En cuanto a la prevalencia; de los genotipos más destacados, nosotros obtuvimos los mismos resultados.

Tanto la mujer como el hombre pueden ser portadores asintomáticos y vehículos de la infección genital por VPH. El virus se transmite con facilidad por contacto sexual, probablemente a través de erosiones mínimas o imperceptibles de la piel o mucosa del área genital⁹. La infección por VPH está íntimamente relacionada con la conducta sexual de las pacientes, y quizá el factor más influyente sea la edad de inicio de las relaciones sexuales tal como se comenta en la literatura^{8, 14, 15}. El conocimiento sobre la historia natural de la infección por VPH nos muestra que las infecciones genitales por VPH se adquieren rápidamente después del inicio de las relaciones sexuales tal y como lo observamos en nuestro estudio.

El rango de edad de las pacientes estudiadas fue de 15 a 68 años ellas refirieron haber tenido un inicio de vida sexual activa a los 13-15 años, en un 17.2%, de 16-18 años el 46% y de 19 y más años el 36.8% restante. Se ha descrito en diferentes estudios que existen variaciones que modifican el comportamiento sexual de las mujeres que condicionan los diferentes patrones de infección por VPH, como se menciona en el artículo "El panorama epidemiológico de la mortalidad por cáncer cervicouterino en México 1990-2010", en promedio la juventud inicia su vida sexual entre los 15 y 19 años⁸. La temprana edad y el incremento en el número de parejas sexuales están asociados con la posibilidad de coinfecciones y genotipos de mayor riesgo oncogénico de VPH^{8, 15}. El inicio de vida sexual a edad temprana, constituye uno de los principales riesgos ante la motivación por pertenecer a un grupo social o las mismas presiones de la sociedad juvenil, derivadas por mensajes de los medios masivos de comunicación que generalmente expresan modelos de convivencia inadecuados que generan necesidades y actos ficticios¹⁵.

En nuestra población estudiada con infección por VPH la edad media de inicio de vida sexual fue menor (21.5 años) comparada con las pacientes sin infección por VPH (29.4 años); así mismo, se observó con las pacientes de 15-25 años en

61.5% presentaron infección por genotipos de VPH BR, con mínimo riesgo de progresión hacia la malignidad, tratándose muy seguramente de infecciones transitorias; en comparación con las pacientes de 26-45 años quienes presentaron infección por VPH-AR en 42.8% y las pacientes de 46 y más años con 60% de infección para VPH-AR; hablando de la alta posibilidad de progresión hacia la malignización de acuerdo a los diferentes factores que pueden favorecer este padecimiento^{2,3}.

Con datos previos y los datos obtenidos en nuestro estudio nos muestran que existe mayor riesgo de infección por VPH cuanto más temprano sea el inicio de vida sexual así mismo el incremento en el riesgo de progresión hacia lesiones malignas se va observando conforme la edad avanza, esto debido al comportamiento sexual durante el transcurso de la vida de estas pacientes³.

En cuanto a la relación de la edad de inicio de vida sexual activa y el tipo de lesión cervical observamos que nuestras pacientes con diagnóstico de carcinoma tienen edad media de inicio de vida sexual activa antes de los 15 años. Estos resultados están acorde con la literatura en que se demuestra una relación entre el aumento del riesgo del cáncer cervical y la edad temprana de inicio de vida sexual activa como se hace constar en el artículo "Infección por virus del Papiloma Humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis" haciendo mención que al iniciar una vida sexual activa antes de los 20 años tienen mayor actividad sexual durante toda su vida y por consiguiente más tiempo de exposición y probabilidades de estar en contacto con diferentes tipos de virus del papiloma¹.

La edad de inicio de vida sexual activa y el número de parejas sexuales a lo largo de la vida en nuestro estudio fue del 53.8% del total de pacientes de 15-25 años, el 46.9% de 26-45 años y el 48% de las de 46 años y más, refirieron haber tenido de 2-4 parejas sexuales a lo largo de su vida; dejando la monogamia en un índice muy por debajo de los datos encontrados.

Hernández y Padilla en el 2012 en su artículo "Factores de riesgo en adolescentes para contraer el Virus del Papiloma Humano" realizaron un estudio analítico descriptivo y retrospectivo en una muestra de 70 adolescentes de población mexicana y encontraron infección del VPH en un 72.9% de los jóvenes con dos o más parejas sexuales¹⁵.

Es interesante ver como el número de parejas sexuales disminuye con la edad de las pacientes como reflejo del cambio de comportamiento sexual. Esto confirma nuestros hallazgos obtenidos que cualquier pacientes con dos o más parejas sexuales son más propensas de adquirir VPH.

Con respecto a la genotipificación de VPH obtuvimos mayor prevalencia hacia los VPH-AR, seguido de los VPH-BR, observamos este dato en mayor relación a las pacientes con 2-4 parejas sexuales y con tipo de lesión cervical LIEAG, así como Ca microinvasor. En pacientes quienes refirieron 1 pareja sexual, presentaron cervicitis, y en quienes refirieron 5 y más parejas sexuales la presencia de LIEBG con mayor frecuencia. Estos resultados son debidos muy probablemente a que el

tamaño de la muestra no fue significativo en los rangos mayores de edad y si aumentáramos el número de pacientes de este grupo de edad, seguramente podríamos encontrar resultados muy parecidos a los referidos en la literatura.

Estudios previamente realizados reportan mayor proporción de mujeres con infección por VPH entre nulíparas que entre las mujeres con hijos. Estos hallazgos corresponden con que las mujeres nulíparas son mujeres más jóvenes y con mayor probabilidad de tener nuevas parejas sexuales recientes y por lo tanto más infecciones por VPH⁸.

Los resultados que obtuvimos en nuestro estudio no concuerdan con lo dicho en la literatura ya que observamos mayor prevalencia de infección por VPH en pacientes quienes ya han tenido hijos que en las nulíparas; teniendo mayor infección las pacientes con 4-5 gestas en un 42.5%. En cuanto al genotipo identificado, observamos que los VPH-AR (43.6%) fueron los que se identificaron en mayor proporción, seguidos por los VPH-BR (37.9%).

La relación que existe entre el número de hijos y las lesiones cervicales, identificamos que el diagnóstico que tuvo mayor prevalencia fueron las LIEBG en 66.6%, predominando en pacientes con 4-5 gestas. Por otro lado observamos que el incremento en el número de embarazos incrementa el riesgo de CaCu, observándose en 75% de los casos identificados entre las pacientes que refirieron haber tenido entre 4-5 gestas y 25% en pacientes que refirieron haber tenido 6 y más gestas.

Lo anteriormente descrito en la literatura a favor de nuestros resultados obtenidos comenta que las gestaciones mantienen la zona de transformación en el exocérnix durante largo tiempo, facilitando la exposición directa al VPH y a otros cofactores. Además los cambios hormonales inducidos por la gestación, como el aumento en los niveles de estrógenos y progesterona, podrían modular la respuesta inmune a la infección por VPH e influenciar en el riesgo de persistencia o progresión de la infección^{6, 9, 19}.

Si hablamos de tabaquismo tenemos un 50.6% de pacientes estudiadas con hábito tabáquico positivo y 49.4% de pacientes no fumadoras. Observamos una relación muy discreta entre la presencia de infección por VPH en pacientes fumadoras con respecto al resto de la población. En cuanto al genotipo identificado de VPH encontramos que los de AR predominan notoriamente en las pacientes fumadoras, sin embargo se presentan en igual proporción entre las no fumadoras.

En cuanto a la relación entre el tipo de lesión cervical y el que las pacientes sean o no fumadoras exponen que el efecto nocivo del abuso en el consumo de tabaco produce sustancias que actúan como oxidantes, elementos cuya acción constituye un mecanismo importante en la inducción de transformaciones malignas celulares⁹. Además se ha demostrado que el hábito de fumar tiene un efecto nocivo en las secreciones vaginales, sobre todo en el epitelio del canal endocervical en donde es el reservorio del VPH, generando su inoculación con mayor facilidad en un ambiente óptimo para su propagación. Algunos autores han

demostrado que las infecciones por VPH en las mujeres fumadoras son de mayor duración, y que tienen menor probabilidad de aclaramiento de la infección por VPH. Por lo tanto las mujeres fumadoras con alteraciones citológicas deberían ser monitoreadas por más tiempo que la población general¹.

Numerosos estudios demuestran que el uso de diferentes métodos anticonceptivos puede influir en el riesgo de infección por VPH y su progresión a cáncer cervical. En el trabajo realizado, solo dispusimos de información del método de planificación usado al momento del estudio, pero no del periodo de tiempo que las pacientes llevan utilizándolo ni la historia de métodos anticonceptivos utilizados con anterioridad, de esta manera observamos que solo 5.7% de nuestras pacientes estudiadas refirieron uso de hormonales en un porcentaje bajo. Sin embargo, hacemos notar que el VPH-AR se identificó en 60% de nuestra población, el 20% para VPH-BR y el otro 20% sin relación alguna con algún genotipo de VPH. En aquellas pacientes quienes refirieron uso nulo de algún método, (37.9%); se identificó en la gran mayoría la presencia de VPH-AR, (45%), seguido por VPH-BR (30.3%) y coinfecciones (15.1%).

En el tipo de lesión cervical y la presencia de VPH, observamos que la LIEBG se presentó en un 66.6%, asociado al uso nulo de métodos de planificación; nos llama la atención que en las pacientes detectadas con Ca microinvasor, ningún caso se relacionó con uso de hormonales, y si con OTB en 50%, y 25% al uso de preservativo. En ambos casos observamos que no existió un método de barrera que protegiera a estas pacientes del contacto sexual directo, existiendo de esta manera un epitelio vulnerable para la infección por VPH.

La leucorrea en relación con VPH observamos que 64.3% de nuestras pacientes estudiadas presentaron leucorrea al momento del estudio, y el restante 35.7% de las pacientes no la presentaban. Observamos que las pacientes quienes presentan leucorrea, están en su mayoría relacionadas con la presencia de VPH-BR en un 48.2%, seguidas por un 37.5% con VPH-AR, 12.5% relacionado con coinfección con genotipos mixtos y solo 1.7% sin presencia de genotipos de VPH. Por otra parte, las pacientes quienes no presentaron leucorrea se relacionaron en 54.8% con VPH-AR, 19.3% con VPH-BR y el mismo porcentaje sin haberse identificado genotipos de VPH. Solo 6.4% de las pacientes presentaron coinfección por VPH.

Con lo que respecta a los hallazgos histológicos, observamos que las LIEBG fueron las lesiones cervicales que se presentaron con mayor frecuencia en nuestras pacientes, tanto en quienes presentaban leucorrea como las que no la presentaron, con un total de 66.6%.

Comparando nuestros resultados con lo mencionado en la literatura, se cita en el artículo: "Factores de riesgo en adolescentes para contraer el Virus del Papiloma Humano"¹⁵. Observamos que los resultados obtenidos en nuestra población de estudio, no cuentan con similitud respecto a lo mencionado en dicho artículo, ya que se menciona que las pacientes quienes padezcan de infecciones vaginales repetitivas o de difícil control, tienen un riesgo incrementado de que se instale una

infección por VPH debido a la inflamación crónica y la producción de mutágenos que ocasionan diferentes microorganismos en el epitelio cervical¹⁵ y en los resultados que obtuvimos en nuestra población fue caso contrario.

A las pacientes estudiadas se les realizaron los estudios de tamizaje ya establecidos para detección de CaCu: Papanicolaou y colposcopia y se complemento la información obtenida con el uso de la técnica de microarreglos.

El estudio de papanicolaou es un método con baja especificidad para la detección del VPH, ya que los coilocitos y los disqueratocitos observados son marcadores inespecíficos debido a que se presentan en diferentes infecciones no solo de tipo Viral como el VPH. La exactitud de la prueba de papanicolaou está limitada por falsos negativos donde el 60% se debe a una muestra insuficiente, y un 40% al realizar la lectura logrando una precisión de apenas 15% en la detección de infección por HPV¹³.

Con respecto al examen colposcópico tiene una alta sensibilidad pero una baja especificidad, además de que lleva a la toma de biopsias innecesarias¹³.

El estándar ideal para un diagnóstico definitivo de infección por VPH es la biopsia seguida de la identificación de material genético de VPH, no obstante, tiene la desventaja de que requiere de un experto que interprete la información microscópica–histopatológica obtenida y esto conlleva un margen de error humano¹³.

Los resultados obtenidos del estudio de Papanicolaou que se realizo en la población en estudio, se encontró que las LIEBG son más frecuentes obteniendo un 43.6%, prevaleciendo entre las pacientes de 26-45 años, con muchas probabilidades de tratarse de infecciones transitorias, la contraparte se encuentra en las pacientes de 46 años y más, donde las LIEAG prevalecieron y se presentaron en 12.6% con lesiones que muy probablemente tienden hacia su progresión. Las pacientes entre 15-25 años con alteraciones inflamatorias y las LIEBG presentaron un epitelio normal con un 4.5% en cada caso.

En los resultados observados por colposcopia comparados con Papanicolaou, obtuvimos una adecuada correlación, observando en el caso de LIEAG la relación al 100% con LIEAG detectada por colposcopia, de igual manera las LIEBG relacionadas con su homónima en 35%; las alteraciones inflamatorias en 19.5% relacionadas con LIEBG, epitelio de características normales relacionado con LIEBG.

En Ca microinvasor se presentaron 3 casos, 1 caso con LIEAG, otra asociada a LIEBG y el otro caso restante vinculado a alteraciones inflamatorias.

Empleando la técnica de microarreglos y analizándola con las lesiones cervicales, observamos que los genotipos de VPH-AR se relacionaron en su mayoría con LIEBG según el reporte patológico; en 47.3% y relacionado al 100% en el hallazgo de 4 casos identificados de Ca microinvasor.

Los genotipos VPH-BR presentaron buena correlación, al presentarse 87.8% vinculados con LIEBG; por otra parte las coinfecciones con genotipos mixtos VPH BR/AR relacionados con LIEBG en 88.8%, y finalmente los casos en que no se

detecto material genético de VPH se relaciona en 57.1% a casos de cervicitis y el restante 42.8% a LIEBG.

Es importante mencionar que en aquellas pacientes que se les realizó un diagnóstico colposcópico-histológico con presencia de infección por VPH y al ver el resultado de genotipificación por medio de microarreglos negativo podemos pensar en la posibilidad a que la plataforma que se maneja solo detecta 35 genotipos y probablemente al existir más de estos genotipos puedan caer en ese rubro.

CONCLUSIONES

- ❖ En nuestro estudio concluimos que los factores previamente estudiados como el inicio de actividad sexual a temprana edad, número de parejas, tabaquismo y el uso de métodos de planificación familiar siguen siendo factores predisponentes para la infección de VPH.
- ❖ La edad media de la infección del VPH fue de 21.5 años, respecto a las pacientes quienes no presentaron infección por VPH 29.4 años. La detección de infección por VPH es más frecuente en edades más jóvenes.
- ❖ Las LIEBG prevalecieron entre las pacientes de 26-45 años, en pacientes de 46 y más años las LIEAG y de 15-25 años las alteraciones inflamatorias y las LIEBG son la que se identificaron con más frecuencia.
- ❖ La técnica de microarreglos tuvo una excelente correlación en la detección de VPH-AR con lesiones de LIEAG, así mismo los genotipos de VPH-BR se relacionaron con LIEBG.
- ❖ Los genotipos de VPH con mayor prevalencia en nuestro estudio fueron el VPH 16 (12.6%), VPH 18 (9.1%), VPH 11 (13.7%) y VPH 6 (13.7%).
- ❖ Las pacientes presentan un aumento significativo de la prevalencia de infección por VPH con el aumento de la severidad de la lesión cervical. Existió heterogeneidad en la distribución de algunos genotipos de VPH según la lesión cervical.
- ❖ Existe un aumento significativo de la prevalencia de infección por VPH AR con el aumento de la severidad de la lesión cervical. Presentando una prevalencia mayor y significativa de infección de VPH por genotipos de AR con respecto a los genotipos de BR y coinfecciones.
- ❖ En todas las lesiones cervicales en que identificamos coinfección, la asociación más frecuentes fueron por 2 genotipos de VPH: de alto y bajo riesgo.
- ❖ En los casos de Ca microinvasor así como en las LIEAG los genotipos más frecuentemente identificados fueron los de AR. Estos resultados obtenidos son importantes para dar un enfoque profiláctico y terapéutico de esta patología a las pacientes afectadas.

- ❖ El rol más claro de las pruebas para detectar VPH es el de mejorar la acertividad del diagnóstico apoyándose del uso de Papanicolaou y colposcopia en pacientes cuyos resultados arrojados sugieran IVPH y contribuir a la detección temprana y específica de mujeres en riesgo.
- ❖ Los beneficios del empleo de técnicas moleculares son mejorar el método diagnóstico para aumentar la sensibilidad de los resultados del Papanicolaou y la colposcopia como estudios de tamizaje para VPH y la mayor identificación de pacientes en riesgo para su mejor manejo y seguimiento.

BIBLIOGRAFÍA:

- 1.-** Lizano, M., Carrillo, A., Contreras A.:“Infección por virus del Papiloma Humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis”. *Cancerología* 2009, Vol. 4, 205-2016.
- 2.-** Palma, I.:“Epidemiología del virus de papiloma humano”. *Revista. Paceaña Medicina Familiar* 2006; Vol 4, No.3, 63-70.
- 3.-** Castro M., Vera-Cala, L., Posso-Valencia Héctor.: “Epidemiología del cáncer del cuello uterino. Estado del arte”. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* 2006, Vol. 57, No. 1, 182-189.
- 4. -** Ferlay J., Soerjomataram, I., Erick, M., Dirshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin Shin H.: “GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence; worldwide in 2012”. International agency for research on cancer. World Health Organization. IARC Cancer Base No.11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://www.globocan.iarc.fr,com.mx>.
- 5. -** Dreyer, C., Disciaciatti, V., Bakalar, K.:“Rastreo de cáncer de cuello uterino”. *Jamma* 2009; Vol., 28, No. 4, 347-363.
- 6.-** Zapata, J., Aguilar, M., Hernández, A., López, J., Ayala L., Luján, P., Burgos J.:“Detección molecular del virus del papiloma humano (HPV) en muestras de epitelio y biopsias de cérvix”. *Revista de Investigación Científica*, 2008, Vol. 4, No. 2, 1-9.
- 7.-** Hidalgo, A.:“El cáncer cérvico-uterino, su impacto en México y el porqué no funciona el programa nacional de detección oportuna”. *Rev Biomed* 2006; Vol. 17, 81-84.
- 8.-** Tovar, V., Guzmán, F., Ortiz, F., R Jiménez, G, Valencia, V “El panorama epidemiológico de la mortalidad por cáncer cervicouterino en México 1990-2010”, *Rev Fac Med UNAM* 2011 Vol. 51, No. 2 Marzo-Abril, 75-86.
- 9.-** Mazarico, E.:“Relación existente entre la infección por los diferentes genotipos de Virus del Papiloma Humano y la presencia de patología premaligna y maligna del cuello uterino”. Reunión nacional de la sección de ginecología oncológica y patología del tracto genital inferior. Logroño 2011, 17-128.
- 10. -** Franco, X., Bosch, M., Muñoz, N., Sherman, M., Jansen, A., Peto, J., Schiffman, M., Kurman, R., Shan, K. “Study Group prevalence of Human Papillomavirus in Cancer: A world perspective. *Cancer Inst* 2005, Vol. 87, No. 11, 796-802.

- 11.** - Park, J., Lee, S., Yoo, C., Kang, S., Park, Y: *“The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses”*. International Journal of Gynecological Pathology 2009, Vol. 14, No. 2, 189-230.
- 12.** – Yamada, T., Manos, M., Pietro, C., Greer, N., Muñoz, F., *“Human Papillomavirus, sequence variation in cervical cancer a world, perspective”*. J. Virol 2007, Vol 71, No. 3, 2463-2474.
- 13.** – Hugh, M., Shingleton, M., Roman, L., Patrick, D., William, W., Johnston, M. Robert, A., Smith, P.: *“The Current status of Papanicolaou smears in cervical pathology”* Cancer J, Clinic 2010, Vol 47, 305-320.
- 14.-** Lazcano, E., Moss, S., Alonso, P., Salmerón, J., Hernández, M.: *“Programa de detección oportuna de cáncer de cuello uterino en países en vías de desarrollo. El caso de México”*. Gaceta médica México 2009, Vol. 4, 155-174.
- 15.-** Hernández, L., Padilla, S., Quintero, M.: *“Factores de riesgo en adolescentes para contraer el Virus del Papiloma Humano”* Revista Digital Universitaria 2012 Vol. 13 No 9, 1067-1079
- 16.** - Burchell, A., Franco, E.: *“Epidemiology of oncogenic and nononcogenic HPV types, and the evidence for differences in their sexual transmissibility”* J Natl Cancer Inst, 2003, Vol 3;14-29.
- 17.-** Grilio, C., Yolima M., Velásquez.: *“Virus del Papiloma Humano: aspectos moleculares y cáncer de cérvix: “Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* 2008, Vol. 59, No. 4, 310-315.
- 18.-** Zapata, J., Aguilar, M., Hernández, A., López, J., Ayala, L. *“Detección molecular del virus del papiloma humano (HPV) en muestras de epitelio y biopsias de cérvix”*. Revista de *Investigación Científica*, 2008, Vol. 4, No. 2, 1870–8196.
- 19.,** Dreyer, C., Discacciatti, V., Bakalar, K. *“Rastreo de cáncer de cuello uterino”*. Obstetricia y ginecología 2008, Vol.157, No. 3, 175-209.
- 20.-** Sadury, Miguel. *“Correlación citohistológica en las neoplasias intraepiteliales cervicales y en la identificación del VPH en esas lesiones”* Revista Cubana Obstetricia - Ginecología. 2009, Vol.35, No.1, 1-11.
- 21.-** Acevedo, R., Álvarez, E., Zafra, R., Álvarez, N., Garigli, P. *“Microarreglos de ADN y cáncer cervicouterino: identificación de marcadores tumorales”*. Ginecología y Obstetricia de México 2007, Vol. 75, 205-213.
- 22.-** Gutiérrez, R.: *“Utilidad de las técnicas moleculares de detección de VPH en el control y prevención del cáncer cervicouterino”*. Archivos Médicos de Actualización en Tracto Genital Inferior 2011, Vol.3, No. 5,16-23.