



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Maestría en Ciencias Médicas

Determinación de genotipos del virus del papiloma humano y su relación con la neoplasia intraepitelial cervical en el Hospital General de Querétaro.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Médicas

Presenta:

Med. Esp. Genaro Vega Malagón

Dirigido por:

Dra. Ma. Guadalupe García Alcocer

SINODALES

Dra. Ma. Guadalupe García Alcocer
Presidente

Dr. Guillermo Enrique Leo Amador
Secretario

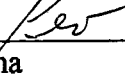
Dr. Carlos Francisco Sosa Ferreira
Vocal

M. en C. Nicolás Camacho Calderón
Suplente

M. en C. Luis Almeida Montes
Suplente

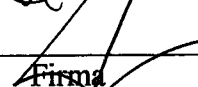
Med. Esp. Benjamín R. Moreno Pérez
Director de la Facultad de Medicina

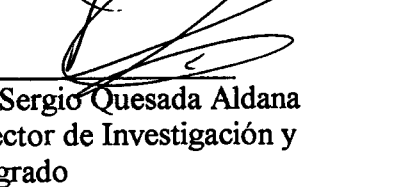

Firma


Firma


Firma


Firma


Firma


Firma
Dr. Sergio Quesada Aldana
Director de Investigación y
Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Marzo 2004
México

BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

No. Adq: H68264

No. Título TS

Clas 616.994

V422d

... ..
... ..
... ..
... ..
... ..
... ..
... ..

RESUMEN

El cáncer cérvicouterino es la neoplasia más frecuente en México y una de las principales causas de muerte en la población femenina, el principal factor de riesgo es la infección por el virus del papiloma humano (VPH).

El objetivo del trabajo fué determinar la frecuencia y los genotipos del VPH en pacientes con citologías exfoliativas sospechosas de infección y su relación con lesiones cervicales preinvasoras.

Se realizó un estudio descriptivo en el periodo del 1º. de Noviembre de 2001 al 30 de Abril del 2003, en pacientes enviadas a la Clínica de displasias de Hospital General de Querétaro y del Hospital de Especialidades del Niño y la Mujer de SESEQ con citologías exfoliativa sospechosas de infección por VPH a las que se les practicó cepillado cervical para el estudio mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de infección por VPH.

Se estudiaron 67 mujeres con una media de edad de 36.4 ± 11.05 años, en 41 (61%) muestras indicaron infección por VPH, en pacientes con lesiones cervicales inflamatorias, la positividad fue del 56% predominando los de bajo riesgo oncogénico (53%), en pacientes con Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC I) fué del 57% con predominio de los de bajo riesgo en un 77%, en NIC II fueron positivos en 56% y mas frecuentes los de alto riesgo (60%). En NIC III todas (100%) presentaron ADN del VPH de alto riesgo. En pacientes con cáncer cervical invasor el 100% de las muestras fueron positivas al ADN del VPH de alto riesgo.

La citología exfoliativa (papanicolau) tiene un alto porcentaje de falsos positivos para diagnosticar infección por VPH, existió una correlación entre mayor grado de lesión cervical, mas frecuente la presencia del virus y de mayor oncogenicidad. La técnica de PCR es de gran utilidad para identificar a pacientes con VPH y alto riesgo de padecer cáncer cérvico uterino.

PALABRAS CLAVE.- Cáncer Cérvico uterino, Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) y virus del papiloma humano (VPH).

SUMMARY

In Mexico, the cervicouterine cancer is the most frequent neoplasia and one of the main causes of death in women. The main risk factor is infection caused by the human papiloma virus (HPV).

The objective was to determine the frequency and (HPV) genotypes in patients with suspected of infection smear tests as well as its relation after to pre-invasive cervical injures.

A descriptive study was made from November 1st, 2001 to April 30, 2003, with patients who attended the Querétaro General Hospital's Displasia Clinic and the SESEQ Children and Women Speciality Hospital suspected of infection citologies after smear tests by HPV. A cervical swiipe out was taken on the patients and sent for study by the polymerase chain reaction technique. (PCR).

67 samples were studied with average of 36.4 ± 11.05 years. In samples analysed by PCR, 41 (61%) were positive for HPV infection. Of patients with inflamed cervical injures 56% were positive with low risk oncogenic patients predominety (53%), patients with intraepitalial cervical noeplasia (CIN I), 57 were positive, with low risk cases predominating (77%). Of patients with CIN II, 56% were positive, more frequently high-risk cases (60%). Of patients with CIN III, all (100%) experienced high-risk VPH' AND. In patients with invasive cervical cancer, 100% tested positive for high-risk VPH' AND.

Cervical citology (papanicolau) presents a high percentage of false positive diagnosis for VHP infection. It was also found that the greater the cervical lesion, the more frequently was detected the presence of the virus and of greater oncogenicity. The PCR technique is very useful in the identification of patients with a high risk of cervical uterine cancer.

Key Words: Cervical Uterine Cancer, Intrapitalial Cervical Neoplasia (CIN) and Human Papiloma Virus.

INDICE

	Página
Resumen	ii
Summary	iii
Indice	iv
Indice de cuadros	vi
Indice de figuras	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
Virus del papiloma humano	7
Historia	9
Epidemiología	9
Descripción del virus	11
Biología molecular del VPH en la carcinogénesis del Cuello uterino	12
Diagnóstico del virus del papiloma humano	21
Reacción de polimerasa en cadena (PCR)	23

III.	METODOLOGÍA	25
	Recolección de datos	26
	Toma de muestras por colposcopia	27
	Tinción de papanicolau	28
	Estudio histopatológico	28
	Extracción de ADN	30
	Reacción en cadena de la polimerasa	30
	Purificación de los fragmentos de ADN	31
	Secuenciación	32
IV.	RESULTADOS	33
V.	DISCUSIÓN	52
VI.	CONCLUSIONES	56
VII.	LITERATURA CITADA	58
VIII.	DATOS DE IDENTIFICACIÓN	62
IX.	FIRMAS DE LOS INVESTIGADORES	63
X.	ANEXOS	64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
3.1	Edad de las pacientes con citologías sospechosas de VPH.	37
3.2	Número de gestas de pacientes con citologías sospechosas de VPH.	38
3.3	Citologías sospechosas de VPH enviadas a PCR.	39
3.4	Resultados de PCR y lesiones cervicales.	40
3.5	Muestras positivas por PCR y su clasificación oncogénica.	41
3.6	Lesiones inflamatorias y VPH.	42
3.7	Neoplasia intraepitelial cervical y VPH.	43
3.8	Cáncer invasor y VPH.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		página
4.1	Edad de las pacientes con citologías sospechosas de VPH.	37
4.2	Número de gestas de pacientes con citologías sospechosas de VPH.	38
4.3	Citologías sospechosas de VPH enviadas a PCR	39
4.4	Resultados de PCR y lesiones cervicales.	40
4.5	Muestras positivas por PCR y su clasificación oncogénica.	41
4.6	Lesiones inflamatorias y VPH,	42
4.7	Neoplasia intraepitelial cervical y VPH.	43
4.8	Cáncer invasor y VPH.	44
4.9	Electroforesis de ADN.	45
4.10	Electroforesis de ADN.	46
4.11	Frotis inflamatorio.	47

4.12	Frotis de lesión de bajo grado (NIC I).	48
4.13	Frotis de infección por VPH.	49
4.14	Frotis de lesión de alto grado (NIC II).	50
4.15	Frotis de lesión de alto grado (NIC III).	51
4.16	Frotis de carcinoma invasor.	52

I.- INTRODUCCIÓN.

El cáncer cervicouterino es la primera causa de morbilidad y mortalidad por esta enfermedad en los países en desarrollo y representa una de las principales causas de muerte en la población femenina, se reportan más de 500 000 casos nuevos anuales, y casi 200 000 mujeres mueren anualmente por la enfermedad. A nivel mundial representa el 7.6% del total de muertes por cáncer en la mujer, ocurre con mayor frecuencia en la etapa más productiva de la vida de la mujer (entre los 30 y 50 años de edad) por lo que representa un serio problema socioeconómico y de salud nacional.

La adquisición de la enfermedad se ha asociado con el inicio temprano de la actividad sexual, la promiscuidad, el uso de anticonceptivos orales, la multiparidad, la desnutrición con bajos niveles socioeconómicos y la inmunosupresión. Los programas para la detección oportuna del cáncer cervicouterino no han reducido el número de defunciones en México ni en la región centro. Lo factores que en mayor medida han impedido abatir la mortalidad son el bajo nivel de cobertura y la utilización tardía de los servicios de salud por los grupos de mayor riesgo.

El cáncer cervicouterino está precedido de una serie de alteraciones celulares en el epitelio cervical denominada neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Actualmente se acepta que el virus del papiloma humano (VPH) es el principal agente etiológico infeccioso asociado al cáncer cervicouterino (CaCu) y la NIC, esta asociación es particularmente importante en los tipos de VPH que se han denominado de alto riesgo (VPH-AR) principalmente VPH 16, 18, 31, 33, 35, 52, 56 y 58). Estos tipos de VPH-AR se han detectado en más del 90% de los casos de cáncer invasor y entre 80% y 90% de los casos de NIC, los tipos virales mas comúnmente asociados con estas lesiones son el VPH – 16 (50 – 55%) y el VPH – 18 (15-20%). Se considera que la persistencia del VPH-AR conduce a la progresión de las células cervicales.

La diferencia entre una alta prevalencia de infección por VPH (11 – 80%) en mujeres sanas jóvenes, la baja incidencia de NIC y progresión de lesiones, apoya la hipótesis de que el VPH puede ser una causa necesaria, pero insuficiente para explicar la aparición de NIC y cáncer invasor.

La presencia de VPH parece explicar muchos de los factores de riesgo establecidos para neoplasia cervical, incluyendo el comportamiento sexual y el tabaquismo. En la población de mujeres mexicanas son pocos los estudios que hacen referencia a la frecuencia o a la asociación entre la infección por el VPH y el NIC.

En la última clasificación epidemiológica de los tipos de papiloma virus humanos asociados al cáncer cervical, llevada a cabo por la Agencia Internacional para el Estudio del Cáncer en el año de 2003 basada en 11 estudios de casos y controles de 9 países que involucraron a 1918 mujeres con cáncer cervical y 1928 controles, se clasificaron como los VPH de alto riesgo a los tipos en orden de frecuencia: 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 39, 51, 56, 59, 68, 73 y 82. Fueron clasificados como de probable alto riesgo: 26, 53 y 66, mientras que los VPH de bajo riesgo: 6,11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108, en esta última clasificación existe una adecuada concordancia con la clasificación en agrupación filogenética.

La actual clasificación oncogénica de los diferentes tipos de VPH tiene importantes implicaciones para la prevención del cáncer cervical así como para el cuidado de las pacientes y estrategias de escrutinio.

HIPÓTESIS.

A.- A mayor grado de lesión cervical, más frecuente la prevalencia de infección por el virus del papiloma humano.

B.- A mayor grado de lesión cervical, más frecuente la prevalencia de infección por el virus de alto riesgo.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar la frecuencia y los genotipos del virus del papiloma humano en pacientes con lesiones sospechosas de infección, por citología y/o colposcopia y su relación con lesiones cervicales preinvasoras que acuden a la Clínica de displasias del Hospital General de Querétaro y del Hospital de Especialidades del Niño y la Mujer de SESEQ.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Estudiar la presencia del VPH y su genotipo en pacientes que acudan con hallazgos sospechosos citológicos y/o colposcópicos de infección.

Determinar por grupos de edad y paridad la frecuencia de lesiones cervicales y su relación con infección por VPH.

Explorar la frecuencia de los diferentes genotipos del VPH con los diferentes estadios de lesiones cervicales preinvasoras.

Conocer la frecuencia y genotipo del VPH en pacientes con cáncer cervical invasor.

II.- REVISIÓN DE LA LITERATURA.

El cáncer cervicouterino es un problema de salud pública a nivel mundial, que afecta con mayor intensidad a mujeres de habla hispana y en particular a las latinoamericanas en edad productiva en forma considerable, es la causa número uno de mortalidad por neoplasia maligna en mujeres de países en desarrollo. Se estima que la tasa de incidencia de CaCu desde 1980 se ha incrementado considerablemente y que desde ese mismo año ocupa la segunda causa de muerte en todo el mundo, los trabajos desarrollados al respecto indican que la gran mayoría de los casos se encuentran en poblaciones latinas con etapas avanzadas de la enfermedad (Novoa y col. 2001)

Esta neoplasia es el segundo cáncer más común en mujeres a nivel mundial y la más frecuente en mujeres latinoamericanas, se reportan mas de 500 000 casos nuevos anuales y constituye el 7.6% del total de muertes por cáncer en la mujer a nivel mundial, casi 200 000 mujeres mueren anualmente por la enfermedad. (Hernández y col 2002, González y col. 2002, Muñoz y col. 2003).

Al analizar las tasas de mortalidad por cáncer cervical en diferentes países, se observa que la variación de la mortalidad es notable con tasas que llegan a ser ocho veces más alta en los países de “ alto riesgo” en Latinoamérica, el sudeste Asiático y África, respecto a algunas naciones de Europa, a Japón y a Australia (Boyle y col. 1997). Así mismo, cuando se comparan las tasas de mortalidad ajustadas de Canadá y Estados Unidos de América (EUA), con los países de América Latina cuya información sobre mortalidad es confiable (Colombia, Venezuela, Costa Rica), se hace evidente que dichas tasas son más altas en estos últimos países pues, además de la elevada cifra de defunciones por cáncer cervical que presentan, ocupan así mismo los primeros lugares en mortalidad por tumores malignos, inclusive, en las últimas décadas se ha observado un aumento en la mortalidad por cáncer cervical en países como Chile, Costa Rica y México (Castañeda y col. 1998).

Las tasas de mortalidad por cáncer en México muestran una marcada tendencia creciente en las últimas décadas. Los tumores malignos en México ocupan el segundo lugar como causa de muerte en la población general y, dentro de éstas, el cáncer cervical representa el tercer lugar como causa de defunción por neoplasias malignas y primer lugar si se toma en cuenta solo al sexo femenino (Vargas 1996, Castañeda y 1998). Así mismo, dicha neoplasia constituye 21.4% del total de neoplasias malignas, 35% de las que afectan a la mujer y 85% de las ginecológicas (Secretaría de Salud 1997).

De acuerdo con los resultados obtenidos en diversos estudios epidemiológicos, el cáncer cervical ocurre con mayor frecuencia en la etapa más productiva de la mujer, es decir entre los 30 y 50 años de edad (Taja y col. 1996), los factores asociados en forma más consistente son la infección por el virus del papiloma humano, actualmente considerado como el más importante (Ramírez y col. 1989 y Lizano y col. 1997).

Entre los demás factores asociados al cáncer cervical se encuentran los hábitos sexuales (antecedente de dos o más parejas sexuales o el inicio de la vida sexual a edad temprana), los factores de riesgo reproductivo en la mujer (como la multiparidad vaginal o el consumo de anticonceptivos de tipo hormonal), la desnutrición, el bajo nivel socioeconómico y la inmunosupresión y otros como el tabaquismo, que aún es controversial (Lazcano y col. 1995). Las observaciones previas, apoyan la hipótesis que considera al carcinoma cervical como un padecimiento de transmisión sexual con fuerte componente infeccioso, ya que los numerosos microorganismos adquiridos por esta vía lesionan la mucosa cervical promoviendo la transformación del epitelio (Guijón y col. 1985) y (Reeves y col. 1989). Se ha postulado el efecto sinergia del virus del herpes simple tipo 2 y del tabaquismo en la patogénesis del carcinoma del cuello uterino (Syrjanen y 1980).

El cáncer cervical está precedido de una serie de alteraciones celulares en el epitelio cervical denominada neoplasia intraepitelial cervical (Buckley y col. 1982). La prevalencia de lesiones cervicales con infección por virus del papiloma humano varía del

11 al 80% (Hernández y col. 2002), en mujeres sanas jóvenes, la baja incidencia de NIC y progresión de las lesiones, sugieren fuertemente que el VPH puede ser una causa necesaria, pero insuficiente para explicar la presencia del NIC y cáncer invasor (Moscicki y col. 1989), sin embargo el Instituto de Salud Pública a través de su centro de investigaciones de salud de poblaciones considera conservadoramente la prevalencia citológica de infección por VPH del 10% en la población femenina la cual aumenta de acuerdo a la población estudiada (Zamora y Terrés 1998).

Actualmente se acepta que el virus del papiloma humano es el principal agente etiológico infeccioso asociado a las lesiones al cáncer cervical y a la neoplasia intraepitelial cervical, esta asociación es particularmente fuerte con los tipos de VPH que se han denominado de alto riesgo (VPH – AR) principalmente VPH 16, 18, 31, 33, 35,39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, y 82 (Muñoz 2003). Estos tipos de VPH – AR se han detectado en más del 90% de los casos de cáncer invasor y entre 80 a 90% de los casos de NIC

(Hernández y col. 2002). Los tipos virales más comúnmente asociados a estas lesiones son el VPH-16 (50 – 55%) y el VPH-18 (15 – 20%), se considera que la persistencia del VPH –AR conduce a la progresión de las lesiones cervicales (Keng y Anders 1996).

II. 1.- VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

El virus del papiloma humano (VPH), tiene importancia por ser una de las infecciones más frecuentes a nivel mundial, estar asociada con cáncer anogenital, de tratamiento complejo, no existe antiviral específico y todas las modalidades terapéuticas tienen alto índice de recidivas y muy probablemente no se erradica, lo mejor es la prevención, con el uso del condón, mejores hábitos higiénicos y controles citológicos semestrales o anuales dependiendo de los factores de riesgo (Vargas y 1996 y Richard 1987).

Este tipo de lesiones se clasifica en:

- A).-Latentes. (asintomáticas): no tienen lesiones visibles y son detectadas por técnicas moleculares.
- B).- Subclínicas: se identifican por medio de colposcopia.
- C).- Clínicas: Se manifiestan como condilomas acuminados.

Las manifestaciones clínicas del virus varían dependiendo del sitio, huésped, y tipo de virus, la infección anogenital incluye más de un sitio (Vargas 1996).

El virus del papiloma humano presenta un problema multidimensional para los ginecólogos y urólogos, la incidencia de esta infección se ha incrementado de tal forma que actualmente es la infección viral mas frecuente del aparato genital. El VPH se trasmite por contacto sexual, pero no se ha precisado el mecanismo exacto de infección a nivel de la interacción virus-célula del huésped. (Cano y col. 1995).

El cuadro clínico es variable, con remisiones y exacerbaciones. Con los avances en la Biología Molecular, su diagnóstico y tipificación han modificado su tratamiento. Existen diversos tratamientos que dependen de la experiencia del médico y de las características de las pacientes, algunas veces su erradicación es imposible ya que nunca desaparece del aparato genital (Vargas 1996).

Las consecuencias a largo plazo de la mayoría de las enfermedades de transmisión sexual son más serias para las mujeres que para los hombres. La mayoría cursa con pocos síntomas, por lo que frecuentemente no son tratadas, lo que resulta en una serie de consecuencias adversas como son los embarazos ectópicos, la esterilidad e infertilidad, infección transplacentaria del feto, parto prematuro e infección del recién nacido a través del canal de parto contaminado. De la misma manera la infección por VPH a nivel genital es asociada con displasia cervical y puede ser cofactor en el desarrollo de cáncer genital.

El tratamiento es múltiple e incluye agentes citotóxicos, cirugía, inmunoterapia y abrasión por laser (Cano 1995).

II. 2.- HISTORIA.

La primera descripción de las verrugas se encuentra en los escritos de Celso (25 DC), el origen viral de las verrugas lo postuló Ciuffo en 1907 y Strauss en 1949 identificó al virus. La transmisión sexual de las verrugas fue sugerida en 1954 por Barret En 1956 Hoss y Durfee acuñaron el término “ atipia coilocítica “.Papanicolau fue el primero en descubrir células originadas a partir de las verrugas, con el término de “ halo perinuclear “ en 1960. Posteriormente en 1969 Almeida señaló la heterogeneidad de los tipos de HVP y Meisels postuló al coilocito en la citología exfoliativa como patognomónico de infección por HVP en 1976. En ese año se estableció la heterogeneidad genética de los papilomas, lo que condujo a Gissman, Pfiter y Zur Hausen a identificar cuatro tipos de VPH diferentes en 1977. En 1983 ocurrió un suceso importante que relacionó al VPH con cáncer, cuando Durst identificó ácido desoxiribonucleico de VPH en cánceres cervicales, sin embargo la primera descripción de esta asociación fue descrita por Lewandowski y Lutz en 1992 en un paciente con epidermodisplasia (Vargas 1996).

II. 3.- EPIDEMIOLOGÍA.

La infección por VPH es la más frecuente de las transmitidas sexualmente, debido quizá a los cambios en la conducta sexual. Se considera que del 11 al 80% de todas las mujeres en edad fértil tienen VPH (Henrnández y col. 2002) otros estudios que se han hecho en poblaciones que acuden a programas de detección a clínicas de atención de enfermedades de transmisión sexual, notifican prevalencia de 9 al 13%, en función del tipo de población estudiada (Zamora y Terrés 1998).

Alrededor del 25 a 65% de las personas que han tenido contacto sexual con personas infectadas la adquieren y solo 60 a 80% de los infectados a nivel anal informan una relación ano genital.

La prevalencia de lesiones del cérvix uterino con infección del VPH varía del 10 al 80%, actualmente se conocen más de 90 tipos virales genéticamente diferentes, y solo algunos de ellos están asociados al cáncer genital, en especial los tipos VPH 16 y 18. En México, en el 90% de los carcinomas cervicales se detecta algún tipo viral: el VPH 16 se encuentra en el 50% de los casos; el VPH 18, en el 15%; el VPH 31, 33 y 35 en conjunto en el 12% y los otros tipos virales en el porcentaje restante (De la Torre y col.1994, Berumen y col. 1997).

La transmisión es generalmente de tipo sexual, aunque se sugieren otros como la autoinoculación, fomites, iatrogénica durante la exploración ginecológica y anal con el mismo guante, instrumental mal esterilizado y en mujeres núbiles, esto ha sido confirmado por medio de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida pueden tener varios tipos de VPH simultáneamente o cambiar rápidamente de un tipo a otro, la situación se ha tornado un problema de salud pública que requiere de implementar medidas de urgencia (Vargas 1996 y Zamora y Terrés 1998).

La edad más frecuente en que se presentan los condilomas es entre los 16 y 25 años, con predominio en mujeres blancas con relación a negras de 2:1, en hombres no hay diferencias. Las adolescentes experimentan un alto riesgo de exposición a enfermedades de transmisión sexual, en parte porque la adolescencia es un tiempo de curiosidad sexual, experimentación y el riesgo es tomado, en adición a los factores psicológicos, los factores biológicos hacia las mujeres adolescentes han hecho que sean más vulnerables que los adultos a las infecciones genitales, en la pubertad temprana, el epitelio columnar en el útero se extiende desde el canal endocervical a la vagina y no hay protección para los patógenos por la mucosa cervical (Cano 1995).

Se desconoce su historia natural y establecer la forma de trasmisión es difícil, sin embargo, el intervalo entre la exposición y la detección de la infección varía de 3 semanas a 8 meses con una media de 3 meses, lo cual tiene importancia al buscar contactos, un compañero sexual previo y no el actual puede haber sido el origen del contagio, dejando a la persona sin explicación. Al parecer los condilomas acuminados afectan a ambos sexos, en tanto que el papiloma plano rara vez da origen al condiloma florido en el hombre, la piel del pene parece menos susceptible a la aparición de la neoplasia intraepitelial, a diferencia de la zona de transformación cervical que puede llegar a evolucionar a un carcinoma (Vargas 1996).

No todas las personas con verrugas genitales o infecciones subclínicas presentan neoplasia intraepitelial cervical (NIC) o cáncer, pueden persistir, crecer o involucionar espontáneamente, la regresión espontánea depende de la inmunidad celular. El aumento de anticuerpos virales que coincide con la regresión de las verrugas probablemente refleje la destrucción de las células tumorales y la correspondiente liberación de antígenos virales intracelulares, los anticuerpos específicos del VPH probablemente tengan mayor importancia como defensa contra la diseminación que como factor para la curación. El ritmo de regresión espontánea en la mujer ocurre, 30% en 3 a 6 meses, una verruga raramente dura mas de 5 años, por lo que se puede considerar que la historia natural de la enfermedad y el poder oncogénico del VPH son impredecibles. Es importante recordar que la eliminación del condiloma acuminado no significa desaparición del VPH. Cada colonia de virus tiene su propio ciclo reproductor (Hans y Krebs 1989, Hans y Sonia 1994, Gerard y Nuovo 1989).

II. 4.- DESCRIPCIÓN DEL VIRUS.

Los VPH son estructuras icosaédricas de 55 micras de diámetro con un núcleo central denso de DNA, una cápsula proteínica que le rodea. El DNA del VPH es de doble banda y se presenta en forma de círculo cerrado, con 800 pares de bases, son virus epiteliotrópicos, infectan los núcleos de células epiteliales, dentro del núcleo, el DNA del VPH se encuentra como episoma, o sea una estructura próxima no integrada al DNA de la

célula huésped, la clasificación de los VPH se basa en el análisis serológico de determinantes antigénicos u homología de los nucleótidos. Los genomas del VPH se dividen en regiones tempranas (E) y tardías (L), de las que esta última codifica proteínas estructurales, y los genes de la primera codifican proteínas requeridas para la replicación (Garfias y col. 1995).

Más de 90 tipos del VPH han sido identificados, y más de 20 se han asociado con infecciones anogenitales y se han subclasificado de acuerdo con su relación con la neoplasia intraepitelial cervical y cáncer, como de bajo riesgo: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54,61,70,72, 81 y CP6108 y de alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, y 82 y de probable alto riesgo: 26, 53 y 66 (Muñoz y col. 2003).

II. 5.- BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VPH EN LA CARCINOGENESIS DEL CUELLO UTERINO.

El VPH se asocia con NIC 10 veces más que en grupos control, la citología negativa, pero positiva a ADN del VPH, demostró 11 veces más riesgo de desarrollar NIC II o NIC III en los próximos 2 a 3 años, y las mujeres con VPH 16 y VPH 18 tienen aun más riesgo que aquellas con virus de bajo o intermedio riesgo. El VPH 16 se asocia más a cáncer epidermoide y el VPH 18 a adenocarcinoma y de células pequeñas lo que indica que el VPH 18 tiene mayor riesgo de neoplasia invasora que los otros tipos (Vargas 1996).

El genoma de algunos papilomavirus humanos se encuentra presente en la mayoría de los tumores del cérvix. Los productos de los oncogenes virales E6 y E7 inactivan a los productos de los genes supresores p53 y Rb. La E6 se une a la proteína supresora p53, provocando pérdida de su función, la E7 se une al gen Rb del retinoblastoma (fig 1). La proteína p53 controla la progresión de las células del reposo al crecimiento. Los daños al genoma celular elevan los niveles de p53 e inhiben esta progresión. Esto permite la reparación del DNA antes de su duplicación, las células que pierden este control replican su DNA dañado, lo cual genera inestabilidad genómica, la proteína E6 de los VPH

de alto riesgo interacciona con p53 e induce su degradación. En las lesiones del cérvix la expresión de los oncogenes E6 y E7 podría contribuir a la inestabilidad genómica celular, y permitiría acumular alteraciones que las llevará al desarrollo tumoral (Toledo y García 1996).

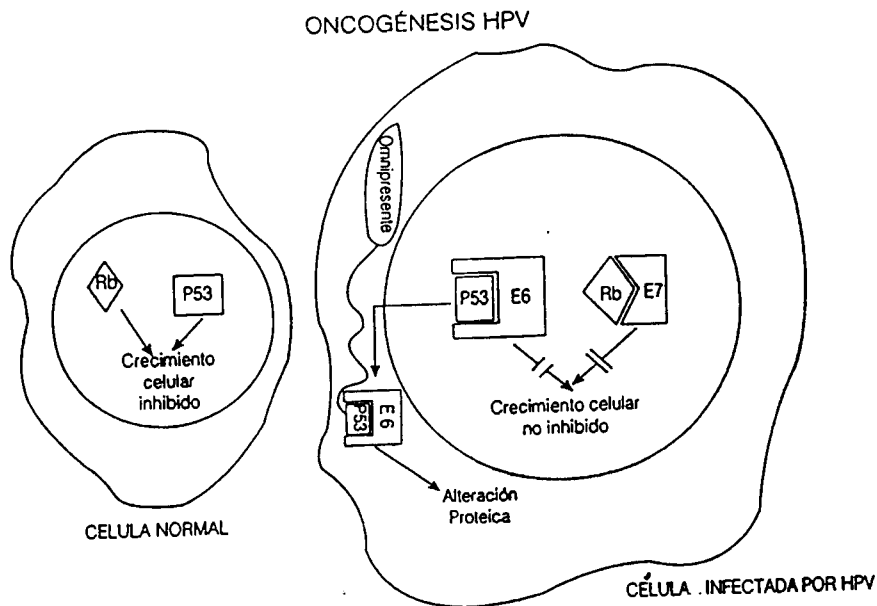


Fig. 1.- Oncogénesis y VPH.- Los productos de los oncogenes virales E6 y E7 inactivan a los productos de los genes supresores p53 y Rb. El E6 se une a la proteína supresora p53, provocando pérdida de su función. El E7 se une al gen Rb del retinoblastoma.

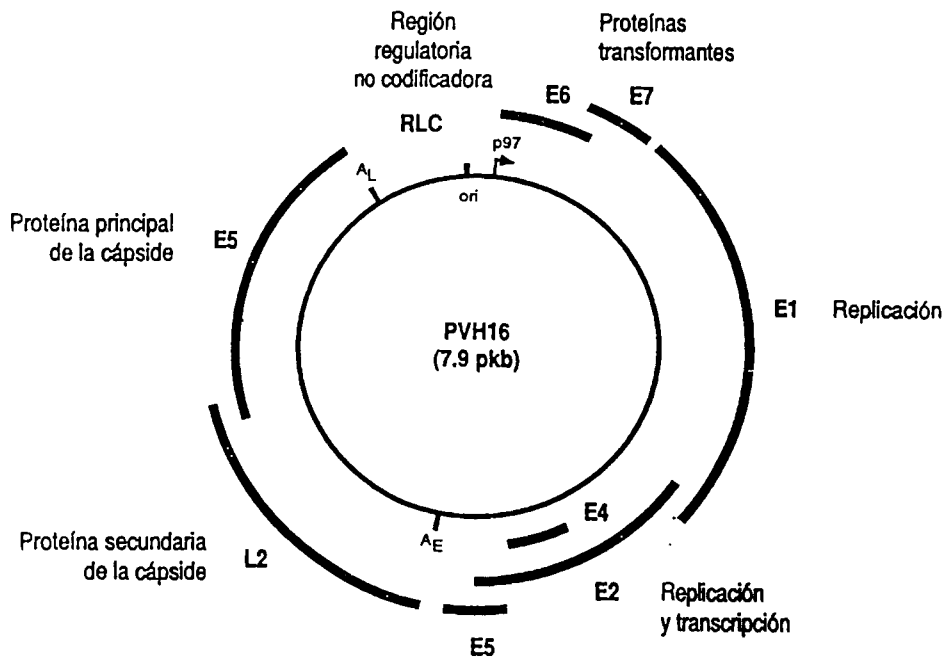


Fig. 2.- Mapa genético del papiloma virus tipo 16.- El genoma circular del ADN de doble cadena contiene 7904 pb. Se muestra la localización de los genes. RLC, región larga de control; Ae y Al, señales de poliadenilación, temprana y tardía respectivamente, p97, promotor temprano que dirige la expresión de E6 y E7. Genes de expresión temprana: E1, E2, E4, E5, E6, E7; genes de expresión tardía L1 y L2.

II.6.- LOS PAPILOMA VIRUS HUMANOS Y SUS ONCOGENES.

El genoma del VPH está formado por una región de control que contiene el origen de replicación y el promotor temprano, y una región codificadora organizada en dos regiones, una temprana (E) y una tardía (L) (Fig. 1). La región temprana contiene 6 genes principales (5 de proteínas tempranas y 1 de tardía) cuyos productos están involucrados en procesos tales como la replicación viral, la regulación de la transcripción, y la inmortalización celular. La región tardía contiene dos genes que codifican para proteínas estructurales de la cápside viral. Las funciones particulares que han sido asociadas a cada gen, así como algunas de sus propiedades se muestran a continuación:

PROTEÍNAS TEMPRANAS:

- E6.- Inmortaliza y modula la transcripción, se une a la P53 e induce su degradación.
- E7.- Inmortaliza y modula la transcripción, se une a Rb inactivándola.
- E2.- Regula la transcripción viral. Se une al DNA, coopera con E1 en la replicación viral.
- E1.- Participa en la replicación viral, inicia la replicación, modula la función E2.
- E5.- transforma, se pierde durante la integración viral.

PROTEÍNAS TARDIAS:

- L1 Y L2.- Proteínas de cápside.
- E4.- Participa en la maduración de partículas virales.

Los VPH pueden ser clasificados en dos grupos: aquellos que infectan los epitelios secos (piel) y los que infectan las mucosas (orales y genitales). Los que infectan las mucosas pueden nuevamente dividirse en dos grupos: los de bajo riesgo de conversión maligna y los de alto riesgo. Entre los VPH de alto riesgo, los tipos 16 y 18 son los que con más frecuencia (aprox. 65%) se encuentran asociados a los tumores del cervix, en estos y en las líneas celulares derivadas de ellos, existe un patrón consistente de integración del DNA viral, el cual permite la expresión continua de los oncogenes E6 y E7. esto se debe entre otros factores, a la pérdida de una región del genoma viral que incluye los genes E1 y E2. La presencia de esta región (E1/E2) y los niveles de amplificación del genoma viral en los tumores que contienen VPH tipo 16 o 18, presentan una asociación muy estrecha (Toledo y García 1996).

Los genes E6 y E7 se expresan activamente en los tumores y en las líneas celulares derivadas de ellos y son clasificados como oncogenes porque sus productos son los responsables de la inmortalización. Estas proteínas interactúan con los productos de dos genes celulares supresores de tumores: E6 se une a la proteína P53 y promueve su

degradación, mientras que E7 se une a la proteína retinoblastoma y forma un complejo inactivo con ella.

El producto del gen E7 es una fosfoproteína nuclear de 98 aminoácidos, ácida y que une al zinc. La proteína E7 de los VPH de alto riesgo es capaz de transformar células primarias de roedores, en combinación con un gen ras activado (mutado).

El producto de E6, es también una fosfoproteína nuclear que une al zinc y tiene propiedades regulatorias de la transcripción, coopera con E7 para immortalizar cultivos primarios de células humanas de epitelios escamosos. Interacciona con la proteína del gen supresor p53 y un factor celular llamado E6AP (proteína asociada a E6) e induce la degradación de p53.

A pesar de las evidencias anteriores, se ha observado que la sola presencia de los VPH de alto riesgo no es suficiente para llevar a las células infectadas hasta el desarrollo de tumor, y que se requieren otros factores para ello, como serían las alteraciones en genes importantes para la carcinogénesis, factores nutricionales, estado inmunológico etc.

II.8.- LOS GENES SUPRESORES DE TUMORES Y LA PROTEINA p53.

La era moderna de la genética molecular del cáncer se inició hace dos décadas con el descubrimiento de versiones celulares normales de los oncogenes virales. Actualmente se sabe que los oncogenes actúan en forma dominante, es decir, la activación de uno de los alelos es suficiente para contribuir a la transformación celular.

Por otro lado, una serie de experimentos había demostrado la existencia de genes recesivos capaces de suprimir la tumorigenicidad. Se sugería que un evento crítico en la carcinogénesis, además de la activación de oncogenes, era la pérdida de genes reguladores negativos del crecimiento, posteriormente denominados genes supresores.

Algunos de los genes supresores de tumores que se han identificado y su localización cromosómica son los siguientes: Rb (13q14); p53 (17p13); WT1 (11p13); DCC (18q21); NF1 (17q11); FAP (5q21.22); MEN-1 (11q13).

El gen p53 es uno de los genes supresores de tumores más estudiado, su producto fue descubierto hace casi 15 años, ahora se conoce que las versiones mutadas de la proteína p53 pueden immortalizar células de cultivo primario, por otro lado la versión normal de p53 suprime la transformación mediada por oncogenes, puede disminuir la tumorigenicidad de células humanas y su sobreexpresión inhibe el crecimiento.

Entre las funciones de la p53 se encuentran:

- Parece estar involucrada en la replicación.
- Regula la transcripción de algunos genes.
- Induce la diferenciación.
- Punto de control del paso de las células de la fase G1 a S del ciclo celular.
- Su alteración parece estar involucrada en la inestabilidad genómica.
- Participa en la apoptosis celular.

Si bien las evidencias actuales sugieren que la proteína p53 está involucrada en el ciclo celular en la transición G1/S, se sugiere que su presencia no es indispensable para la división celular, ya que su participación es como un punto de control que evalúa los daños al DNA y previene su transmisión, esto coincide con el hallazgo de que los ratones que carecen del gen p53 tienen un desarrollo normal, aunque más del 70% de las cepas desarrolla tumores a temprana edad (Hans y Sonia 1994).

II.9.- LOS VPH Y p53 EN LA CARCINOGENESIS DEL CÉRVIX

El p53, es el gen con la más alta frecuencia de alteraciones en los cánceres humanos, esto es de esperarse si se consideran todas las funciones celulares esenciales que son reguladas por p53, por lo que su pérdida o inactivación es un paso clave crítico en la carcinogénesis.

En caso particular del cáncer cervicouterino se presenta un mecanismo alternativo para la inactivación de p53. La región carboxilo terminal de la proteína p53 contiene sitios donde se une la proteína E6 de los VPH, a través de la proteína celular E6AP. Se sabe que la presencia de E6 en este complejo (p53-E6AP-E6) promueve la degradación de p53 a través de la vía de proteólisis dependiente de ubiquitina.

Así se observa que algunas líneas celulares derivadas del cáncer cervical y en los tumores que presentan secuencias activas de VPH de los tipos de alto riesgo, la p53 se encuentra normal. Esto se debe a que p53 es inactivado funcionalmente por E6, haciendo innecesaria su inactivación por mutaciones. Los tumores que no contienen secuencias virales presentan generalmente alteraciones de p53. En los casos donde no se detectan secuencias virales ni alteraciones de p53, se sugiere que su función es eliminada por otros mecanismos, tales como la sobreexpresión de mdm2. Los datos anteriores sugieren fuertemente que p53 juega un papel muy importante en la carcinogénesis de los tumores del cérvix ya que de una u otra manera se elimina su función (Taja y col. 1996, Berumen y col. 1994).

En la Fig. 2, se presenta un modelo que asocia las funciones de p53 en la respuesta al daño del DNA y la presencia de la proteína E6 de los VPH de alto riesgo, con alteraciones del ciclo celular e inestabilidad genómica. Cuando p53 se encuentra funcional, los daños al DNA producen un aumento en los niveles de proteína, la cual modularía la expresión de genes reguladores del crecimiento que resultaría en la detención del ciclo en la

fase G1/S. Esto permitiría la reparación del DNA evitando así que la célula replique su material genético dañado, antes de continuar su ciclo. En el caso de que ocurran daños adicionales, como la activación de oncogenes, p53 promovería la muerte de la célula a través de la inducción del mecanismo de la apoptosis (Toledo y García 1996).

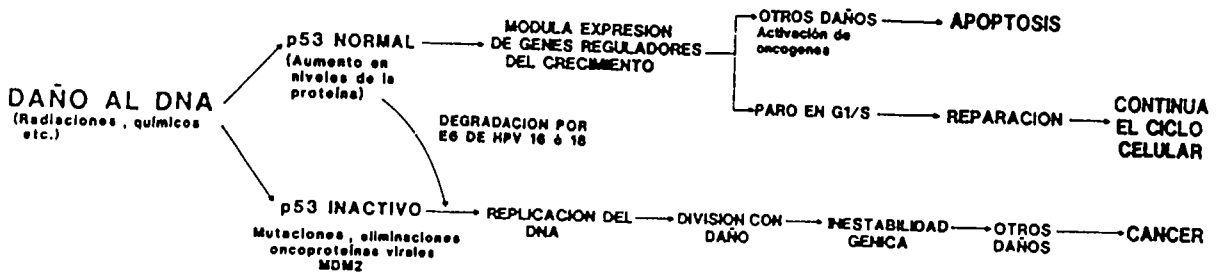
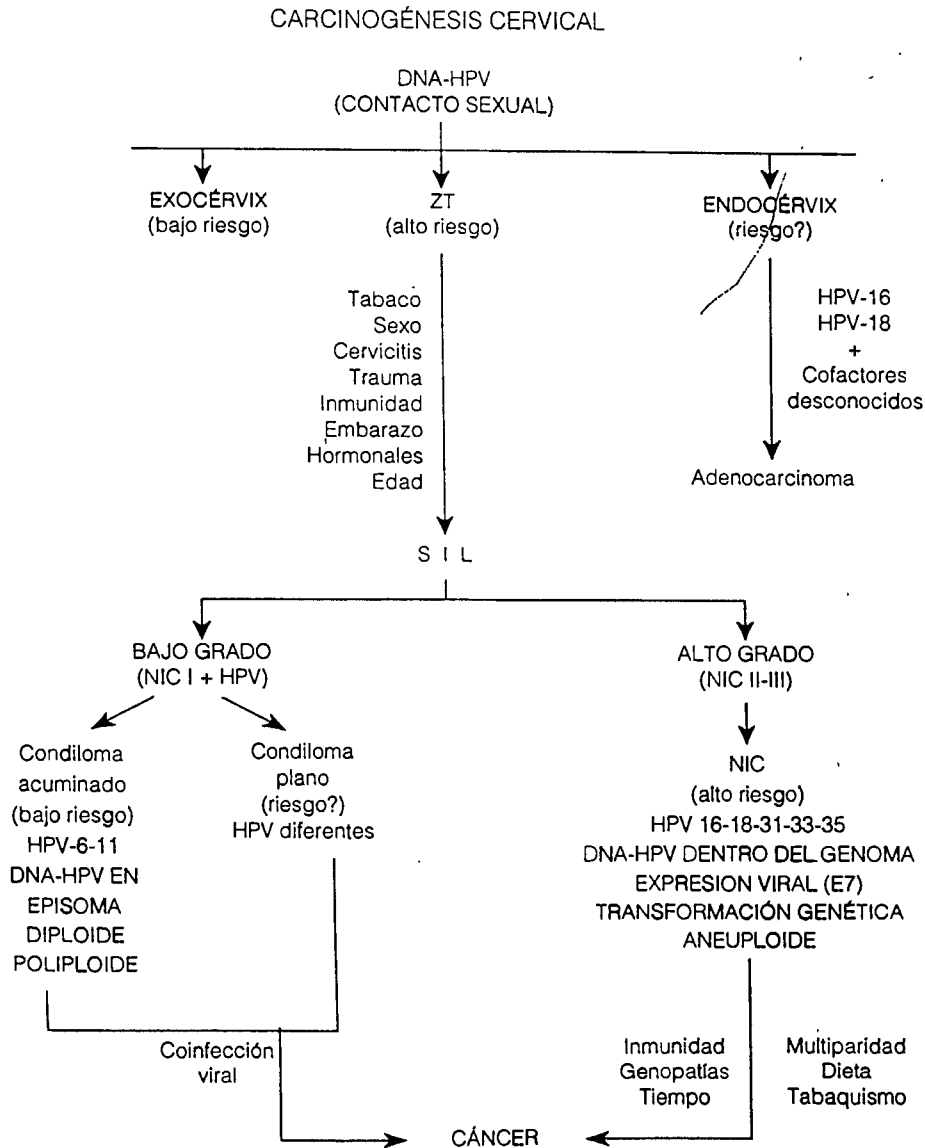


Fig. 2.- Papel de p53 en respuesta al daño celular.- Cuando la p53 se encuentra funcionando normalmente, los daños al ADN producen incremento de la proteína que provoca la detención del ciclo en la fase G1 / S y permite la reparación del ADN y continuar el ciclo o en caso contrario promueve la apoptosis. Si la p53 se encuentra inactiva, los daños al ADN no son reparados y provoca inestabilidad genómica y la aparición de células cancerosas.

Cuando la función de p53 se encuentra inactivada, por la presencia de secuencias virales activas, mutaciones o eliminaciones del gen, o por sobreexposición de mdm2, los daños al DNA no son reparados antes de que la célula replique su material genético. Esto resulta en la acumulación de más daños que conducen a una inestabilidad génica y que favorece finalmente la aparición de células cancerosas.

Sin embargo, seguramente la imagen real es mucho mas compleja, las evidencias recientes señalan que la proteína p53 funciona como un factor de transcripción, que probablemente regula la expresión de varios conjuntos de genes, por lo tanto, no podemos estar seguros que la inestabilidad genómica que presentan las células con alelos mutados de p53, o las células que expresan de manera continua la proteína E6 de los VPH, pueda deberse exclusivamente a las fallas en el punto de control G1/S o a otras de las funciones controladas por p53 (Toledo y García 1996).



II.10.- DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.

Para el diagnóstico de una infección por VPH se cuentan con varios métodos, uno de ellos es la citología exfoliativa (papanicolau) en donde la presencia de koilocitos caracterizados por una gran zona clara perinuclear y a menudo binucleación, son un fuerte indicio de la presencia del virus, aunque se ha informado que partículas virales o sus antígenos son detectados solo en una pequeña proporción en tales células afectadas, por medio de técnicas inmuno histoquímicas como la de peroxidasa-antiperoxidasa (Torne y col. 1997).

La colposcopia es un método que permite visualizar el cérvix adecuadamente, es útil sobre todo para la detección de VPH por la lesión tisular que estos producen, y es una herramienta diagnóstica muy útil para aclarar dudas que no se puedan resolver con la clínica. La introducción de la Biología Molecular a los laboratorios de histopatología ha resultado en un diseño de métodos innovadores en la patología molecular. Mientras que características clínicas pueden indicar una infección viral, el diagnóstico definitivo debe basarse sobre la demostración directa de la presencia del virus a través de cultivo. Para la mayoría de los virus su cultivo es extremadamente tedioso y consumen tiempo, incluso a veces es imposible lograrlo, como es el caso de los VPH. (Gerard y Nuovo 1989, Berumen y col. 1997)

La detección inmunológica de los antígenos de las cápsides virales ha mostrado que no es del todo confiable, en la mayoría de los casos, por la complejidad de la infección viral. Por medio de técnicas de hibridación *in situ* de los ácidos nucleicos utilizando sondas radioactivas específicas para las secuencias de ADN viral, es posible identificar y localizar al virus en las células o tejidos infectados. Las sondas radioactivas en general, aunque muy útiles tienen sus desventajas: el tiempo de exposición en la autoradiografía es largo, la resolución morfológica puede ser pobre y el uso de material radioactivo requiere condiciones especiales en el laboratorio.

Es preferible utilizar las técnicas de hibridación *in situ* por medios no radioactivos, la sensibilidad para detectar secuencias de ADN viral 6, 11, 16, 18 en secciones de tejido incluidas en parafina en biopsias de áreas genitales con este sistema de sondas con marcaje no radioactivo, es comparable a la obtenida con aquellas marcadas radioactivamente.

La hibridación usando la técnica de Southern blot de sondas de ADN extraídos de tejidos frescos, ha sido quizá la prueba más utilizada y sensible tanto para la detección de la presencia como para la identificación de subtipos de VPH y además nos puede dar información si el genoma viral esta en las células como episoma o está integrado al genoma celular, esta técnica requiere una intensa labor en el laboratorio.

El número de tipos distintos de VPH identificados ha ido en aumento rápidamente durante los últimos 15 años, en la actualidad excede de los 90, y aproximadamente la mitad de ellos ha sido aislada de áreas genitales. Se considera un nuevo tipo de VPH sólo si su genoma completo ha sido aislado y establecido la secuencia nucleotídica de sus genes E6, E7 y L1 y que sea diferente en más del 10% de cualquiera de los VPH descritos previamente (Lizano y García 1997, Muñoz y col. 2003).

Se requiere de métodos alternativos para una evaluación rápida y eficiente de detección e identificación, para esto se emplea un método que permite la amplificación de secuencias génicas presentes en muy pequeñas cantidades en el material a investigar, a este método se le ha dado el nombre de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y consiste en que el ADN de doble cadena es calentado hasta su desnaturalización, las cadenas simples se aparean con un par de oligonucleótidos sintéticos específicos llamados iniciadores, estos oligonucleótidos actúan como cebadores para la ADN polimerasa que sintetiza dos nuevas cadenas de ADN complementarias con las cadenas originales. El uso de esta técnica con iniciadores o cebadores puede amplificar una gran gama de tipos de VPH (Berumen y col. 1994 y 1995)

La aplicación de las técnicas moleculares de detección han reafirmado el importante papel que desempeñan los VPH en el desarrollo de CaCu, aún cuando la identificación de los tipos, subtipos y variantes de los VPH es complicada y a menudo compleja, es importante el continuar con este tipo de estudios, así como los encaminados al avance de las lesiones preneoplásicas, la evolución y el tipo específicos de virus asociado a ellas, para tener en un futuro un manejo adecuado que permita un diagnóstico oportuno, la profilaxis, así como el control definitivo de los carcinomas genitales.

II.11.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) .

En la última década los avances en la tecnología en ácidos nucleicos ha brindado una serie de elementos y pruebas prácticas para el diagnóstico de algunas enfermedades infecciosas y genéticas.

Una nueva técnica descrita en 1985, la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), es un ingenioso método que permite la amplificación (aumento en el número de copias), *in vitro* del ácido desoxirribonucleico de una célula, organismo o gen, sin necesidad de cultivos previos.

La técnica de PCR requiere de una enzima termoestable polimerasa Taq (*thermophilus aquaticus*), una secuencia iniciadora (primers) nucleótidos, mezcla de reguladores y el DNA o muestra a analizar.

El principio de la técnica se basa en ciclos repetitivos de 3 reacciones utilizando cambios de temperatura. El primer paso de este procedimiento consiste en la desnaturalización de la doble cadena del DNA original a temperatura elevada, en el segundo paso se lleva a cabo la alineación de las secuencias iniciadores en la posición opuesta al DNA original, el tercer paso consiste en la síntesis del DNA por extensión de las secuencias iniciadoras por la enzima polimerasa taq.

La importancia de este procedimiento es su sensibilidad y su habilidad para amplificar DNA impuro, partiendo de una mezcla de otros DNA y otras sustancias, es posible amplificar secuencias de DNA tan cortas como 50 pb y hasta 2 000 pb de longitud, más de un millón de veces solamente en unas cuantas horas. La especificidad de la PCR deriva de la precisión de la igualdad de las secuencias iniciadoras con la alineación de las cadenas DNA - DNA original.

La PCR rápidamente ha adquirido gran importancia entre los biólogos moleculares por sus numerosas aplicaciones en la práctica médica donde el diagnóstico oportuno de agentes etiológicos influyen en la terapéutica a seguir, resultando un mejor pronóstico para el paciente, así como la disminución de una estancia hospitalaria y costos asociados.

La aplicación de PCR promete ser de gran utilidad en la detección de patógenos para los cuales se requiere sistemas de cultivos difíciles o de largos períodos, o por ser de alto riesgo, considerándose un arma invaluable en el laboratorio de Microbiología, donde también puede ser usada para facilitar el análisis de elementos genéticos que miden resistencia a antibióticos. Lo que a futuro se avisa es una necesidad en el laboratorio clínico que deberá de crear una demanda de profesionistas especializados y la necesidad de establecer un comité para la estandarización de pruebas de diagnóstico molecular (Espinosa y 1993).

III.- METODOLOGÍA

Se realizó un estudio descriptivo, transversal en la clínica de displasias del Hospital General de Querétaro y del Hospital de Especialidades del Niño y la Mujer “ Dr. Felipe Núñez Lara “ de la SESEQ , en el periodo del 1º. de Noviembre del 2001 al 30 de Abril del 2003, entre ellas se incluyeron a todas las pacientes referidas de los diferentes centros de salud del municipio de Querétaro y de dichos hospitales, portadoras de citologías (papanicolau) sospechosas de infección por el virus del papiloma humano, que aceptaron participar en la investigación y completaron todo el protocolo de estudio, que consistió en: a) Colposcopia o visualización directa y amplificada del cuello cervical, b) toma de biopsia de las lesiones en aquellas pacientes que presentaron estudio histopatológico sospechoso, c) Recolección de muestra por cepillado cervical para la detección y tipificación del VPH (DNA / VPH) por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. Las pacientes que presentaron colposcopia no satisfactoria y aquellas en que la muestra del cepillado cervical fue insuficiente, sufrió contaminación por exceso de moco o desecación y no fue posible la extracción del ADN, fueron eliminadas del presente estudio.

De acuerdo al protocolo anterior fueron seleccionadas las pacientes que presentaron en la citología de la biopsia una sospecha de infección por el VPH. Posteriormente se les realizó una evaluación colposcópica convencional, las que presentaron datos colposcópicos de NIC o cáncer invasor se les tomó biopsia dirigida y se enviaron al servicio de patología para su confirmación. Posterior a la colposcopia se les tomó muestra para realizar PCR con un cepillo cervical, inicialmente se removió el exceso de moco con dicho cepillo sin rozar la superficie cervical, se utilizó un segundo cepillo barriendo la zona exocervical, la zona de transformación y el endocervix, las muestras colectadas fueron colocadas en un tubo colector con solución de extracción y almacenadas en refrigeración a 2 a 8° C. Hasta su procesamiento.

La detección del DNA por PCR se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ)

con el apoyo del Laboratorio de Patología Especializada de la ciudad de Querétaro y en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Autónoma de México (UNAM), se utilizaron tres juegos de oligonucleótidos contra la región L1 del VPH y con un par de oligos para el gen β globina humano como control positivo. El producto de la reacción fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se purificó la banda correspondiente. Posteriormente se secuenciaron las muestras utilizando el método fluorescente (Ver Anexo I) y el producto de las mismas fue analizado en el banco de genes en busca de su homología con otras secuencias.

La metodología seguida fue: 1) Recolección de datos, 2) Toma de muestra por colposcopia 3) Tinción de Papanicolau, 4) Estudio histopatológico, 5) Extracción de ADN 6) Reacción en cadena de la polimerasa, 7) Purificación de la banda, 8) Secuenciación.

III.1.- Recolección de datos.

Se diseñó una encuesta para obtener la siguiente información: nombre, domicilio, edad, antecedentes obstétricos, tipo de lesión cervical (proceso inflamatorio, neoplasia intraepitelial cervical o cáncer cervical invasor) hallazgos sugestivos de infección por VPH, resultado de PCR (positivo, negativo) y el genotipo del VPH, la información fue realizada a través de una entrevista dirigida, la toma de muestras y su procesamiento fue realizado por personal especializado.

La información colectada en la hoja de datos incluye el resultado de las entrevistas, revisión de los expedientes clínicos y el diagnóstico molecular del VPH, mismos que fueron capturados en una base de datos con el programa SPSS (Statistical Package of Social Sciences) versión 9.0. El proyecto de estudio fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Hospital General de Querétaro y de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro, y todas las pacientes fueron informadas acerca de la investigación.

III. 2.- Toma de muestra por colposcopia.

Antes de efectuar la toma de la muestra por colposcopia, la paciente recibió una explicación amplia de todo el proceso y las posibilidades de toma de biopsia para estudio histopatológico en caso de observar alguna lesión sospechosa. Se siguieron los siguientes pasos:

- 1.- Preparación de la paciente.- El examen se realizó en días fuera del periodo menstrual, sin uso de cremas o lubricantes vaginales previos y con abstinencia de relaciones sexuales mínimo de 24 hs.
- 2.- Posición ginecológica de la paciente y explicación breve de todo el proceso antes de iniciar el procedimiento.
- 3.- Organización de la bandeja con todos los instrumentos a utilizar.
- 4.- Exploración ginecológica mediante tacto vaginal digital, palpando vagina y cervix en busca de masas o zonas endurecidas.
- 5.- Examen con espéculo vaginal.- se colocó el espejo vaginal lubricado y se realizó una valoración visual inicial, buscando alguna lesión macroscópica antes del examen colposcópico.
- 6.- Lavado salino del cervix.- Se realizó con solución salina antes de la aplicación del ácido acético mediante una torunda de algodón.
- 7.- Aplicación de ácido acético.- Antes de la aplicación se advirtió a la paciente la posibilidad de ligero escozor local, se aplicó mediante torundas impregnadas en toda el área cervical.
- 8.- Identificación de las lesiones.- Primeramente se identificó la zona de transformación, se hizo la valoración colposcópica, describiendo la naturaleza, localización, y extensión de cualquier lesión.
- 9.-Aplicación de soluciones yodadas.- cuando se identificó una lesión sospechosa, se aplicó solución de lugol (Yodo acuoso al 5% y yodo potásico al 10% en agua) para facilitar la zona de donde se tomó un fragmento de tejido para su estudio histopatológico.
- 10.- Realización de la toma de muestra para PCR.- Inicialmente se realizó una remoción del exceso de moco sin rozar la superficie cervical, posteriormente se utilizó un segundo cepillo barriendo la zona exocervical, la zona de transformación y el endocervix, se

depositó la muestra en el tubo colector con solución de extracción con 0.6 ml. de DNAzol. y se almacenó la muestra en refrigeración a 2° a 8° C. Hasta su procesamiento.

III. 3.- Tinción por Papanicolau.

Para efectuar la tinción de las laminillas de las muestras cervicales, se siguieron los siguientes pasos:

- 1.- Alcohol etílico al 96%..... 10 baños (cada baño consiste en la introducción de la laminilla en un recipiente con la solución).
- 2.- Agua destilada 10 baños
- 3.- Hematoxilina 5 baños
- 4.- Agua destilada10 baños
- 5.- Alcohol ácido 6 baños lentos
- 6.- Alcohol etílico 10 baños (se repite en 3 ocasiones)
- 7.- Colorante OG 6 1.5 minutos y escurrir
- 8.- Alcohol etílico al 96% 10 baños (se repite en 3 ocasiones)
- 9.- Colorante EA 50 1.5 minutos y escurrir
- 10.- Alcohol etílico al 96%10 baños (se repite en 3 ocasiones)
- 11.- Alcohol etílico absoluto 10 baños (se repite en 3 ocasiones)
- 12.- Xilol 10 baños (se repite en 2 ocasiones)
- 13.- Montaje en resina de secado rápido.

III. 4 .- Estudio histopatológico.

Una vez que al examen colposcópico se identificó epitelio anormal, se realiza toma de biopsia de aprox. 2 – 3 mm de espesor de tejido y se deposita en un recipiente con formaldehído al 10% y se envió al servicio de patología para su estudio histopatológico. El procedimiento para la tinción de laminillas por el método de hematoxilina y eosina fue el siguiente:

- 1.- Inclusión.
- 2.- Procesamiento de deshidratación en el histokinette.
 - a.- Formol (2 baños)
 - b.- Alcohol etílico al 96% (3 baños).
 - c.- Alcohol etílico absoluto (3 baños).
 - d.- Xilol (2 baños).
 - e.- Parafina (2 baños).
- 3.- Bloqueo en parafina.
- 4.- Corte en el microtomo.
- 5.- Fijación y tinción por el método de hematoxilina y eosina.
 - a.- Xilol (10 baños).
 - b.- Alcohol etílico al 96% (10 baños).
 - c.- Alcohol etílico absoluto (10 baños).
 - d.- Hematoxilina durante 5 minutos.
 - e.- Enjuague en agua corriente
 - f.- Alcohol ácido (3 baños).
 - g.- Introducción en agua con carbonato de sodio durante 10 segundos.
 - h.- enjuague en agua corriente.
 - i.- Eosina durante 2 minutos.
 - j.- Alcohol absoluto (10 baños).
 - k.- Alcohol absoluto (10 baños).
 - l.- Alcohol absoluto (10 baños).
 - m.- Secado durante 5 minutos.
 - n.- Xilol durante 5 minutos.
 - ñ.- Xilol durante 5 minutos
 - o.- Montaje en resina de secado rápido.

III. 5 .- Extracción de ADN

Este método se realizó con DNazol de acuerdo al protocolo de Invitrogen Cat. No. 10503-027, para lo cual se homogenizaron 50 mg de tejido en un homogenizador manual con 1 ml de reactivo DNazol.

Se agregó un volumen de 0.5 ml de etanol al 100% , se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 1 a 3 minutos. El ADN precipitado fue removido con una punta de pipeta y se pasó a un tubo limpio.

El ADN obtenido se lavó 3 veces con etanol al 75%, se decantó, se secó 5 min a temperatura ambiente y se disolvió con 0.3 ml de 8 mM de NaOH al pasar lentamente la suspensión a través de la punta de la pipeta.

La cuantificación se llevó a cabo en espectrofotómetro a una λ de 260 y 280. El cálculo se obtuvo asumiendo que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 μ g de ADN. El radio $A(260/A(280))$ del aislado DNA estuvo dentro del rango 1.6-1-9.

III. 6 .- Reacción en cadena de la polimerasa.

La amplificación de los genes que codifican para los virus de papiloma humano se realizó por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa utilizando 3 juegos de oligonucleótidos: 1) un par de oligos degenerados que amplifica la región L1 del virus del papiloma del que se obtuvo un producto de 250 pb, 2) Un par de oligos que amplifica la fracción MY de la región L1 del que se obtuvo un producto de 450 pb y 3) Un par de oligos que amplifica la fracción GP + de la región L1 de la que se obtuvieron productos de 550 pb.

Se realizaron tres reacciones con cada uno de los pares de oligonucleótidos antes mencionados y corrieron con su control positivo. Los tubos fueron colocados en un termociclador y la reacción de amplificación fue sometida a 40 ciclos de: desnaturalización a 94° C por 60 seg, hibridación a 44° C por 60 seg. y elongación a 72 °C por 60 seg. Como control positivo se utilizó β globina y como control negativo agua. Los productos amplificados fueron observados en un gel de agarosa de 1% teñido con bromuro de etidio.

III. 7.- Purificación de los fragmentos de ADN.

El método utilizado fue de acuerdo a Quiagen para cual las bandas amplificadas de ADN fueron cortadas del gel evitando la mayor cantidad de agarosa posible y se colocaron en un tubo de 2 ml. Se pesaron y se les agregó 3 volúmenes de buffer QG, posteriormente se incubaron a 50 °C por 10 minutos o hasta que el gel fue disuelto, en algunos casos se agitó con vortex cada 3 minutos durante la incubación. Una vez que las fracciones de gel estuvieron completamente disueltas se verificó que el color de la mezcla fuera amarillo y se le agregó un volumen de isopropanol, las columnas se colocaron en un tubo de 2 ml, se agregó la muestra y se centrifugó por 1 minuto, el flujo se descartó. Se colocó la columna en el mismo tubo al que se adicionaron 0.5 ml de buffer QG y se centrifugó por 1 minuto. Para lavar se adicionaron 0.75 ml de buffer PE a la columna y se volvió a centrifugar por 1 minuto.

Se descartó el líquido y se volvió a centrifugar 1 minuto a 13,000 rpm. La columna se pasa a un tubo limpio de 1.5 ml y el DNA se eluyó aplicando 50 μ l de buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) o H₂O al centro de la membrana y se centrifuga la columna por 1 minuto. Alternativamente se incrementó la concentración de ADN y se adicionó 30 μ l de buffer de elusión al centro de la membrana y la columna de volvió a centrifugar por 1 minuto.

III. 8 .- Secuenciación:

El ADN obtenido fue secuenciado en el equipo de ABI Prism 310 Genetic Analyzer del laboratorio de Biología Molecular de acuerdo al método incorporación de dideoxynucleotidos marcados. Un ejemplo de los histogramas obtenidos se encuentran en el (anexo 1). La secuencia de cada fragmento fue analizada en el banco de genes determinar el tipo de virus que corresponde de acuerdo a su homología con los genes descritos (anexo 2). Los datos fueron analizados en los grupos de alto, bajo y probable alto riesgo que se mencionaron en la introducción.

IV.- RESULTADOS.

En el periodo de la investigación las pacientes que se incorporaron al estudio fueron 81, a las cuales se les tomaron muestras para PCR por haber ingresado con citologías sospechosas de infección por VPH, de ellas fueron eliminadas 14 (17%) por ser insuficientes, exceso de moco o por desecación que impedía la extracción del ADN para su amplificación por PCR.

En el total de pacientes que se llevó a cabo la identificación y tipificación del virus del papiloma humano (67 muestras), el promedio de edad fue de 36.4 ± 11 años en un rango de 19 a 77 años. Los grupos de edades formados son: menores de 20 años: 2 casos; de 20 a 29 años: 19 casos; de 30 a 39 años: 21 casos; de 40 a 49 años: 18 casos; de 50 a 59 años: 4 casos; y de 60 o mas años: 2 casos; entre ellos el más frecuente es de los 30 a 39 años (32%) seguida del grupo de 20 a 29 años (29%) y de 40 a 49 años (27%) respectivamente (Tabla y Fig. 1).

En el estudio del número de gestas entre las pacientes se encontró que 19 mujeres (28%) presentaron antecedentes de 6 o más embarazos; seguidas de las nulíparas o primigestas que fueron 17 (25%), 16 con dos o tres embarazos (24%) y en 4 casos (6%) se ignoró su paridad (Tabla y Fig. .2).

De las 67 muestras estudiadas por sospecha citológica de infección por VPH y que se les efectuó la PCR, resultaron positivas 41 (61%), y negativas 26 (39%) (Cuadro y Fig. 3)

Los resultados del estudio histopatológico de aquellas pacientes que se les tomó biopsia dirigida por colposcopia reportaron 23 casos con NIC I; 9 casos de NIC II; 5 casos de NIC III y 3 casos de cáncer cervical, al relacionar los resultados de la PCR con el total de lesiones cervicales, se encontró que de las 27 muestras con alteraciones solo inflamatorias, 15 (56%) resultaron positivas al VPH, el resto (44%) negativas (Cuadro y Fig, 4).

En 37 pacientes portadoras de Neoplasia Intraepitelial cervical (NIC), la frecuencia de infección por VPH fue del 62% (23 pacientes), al estratificar la patología cervical, se encontró que de 23 pacientes con NIC grado I, en 13 (56%) contenían ADN del virus, en pacientes con lesiones de NIC grado II, de 9 muestras, 5 (56) presentaron VPH, y aquellas con NIC III, el 100% (3 pacientes) resultaron afectadas por la infección, de 3 pacientes con cáncer cervical invasor, el total (100%) resultaron positivas a la presencia del VPH (Cuadro y Fig. 4).

En relación a la clasificación oncogénica realizada por la international agency for research on cancer en el 2003, donde agrupan a los genotipos del VPH de bajo riesgo a los tipos: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70 y 72; de alto riesgo a: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82; y de probable alto riesgo: 26, 53, y 66. en el presente estudio, de las 41 muestras con infección por el VPH, 21 (51%) correspondieron a los de bajo riesgo, 18 (44%) de alto riesgo, y solo 2 (5%) muestras se clasificaron como de probable alto riesgo (Cuadro y Fig. 5)

Relacionando los diferentes tipos de lesión cervical con la presencia y capacidad oncogénica del VPH se encontraron los siguientes resultados: De 27 pacientes con lesiones inflamatorias, en 12 (44%) no se encontró ADN del VPH, mientras que en 8 (30%) correspondieron al tipo de bajo riesgo; 6 (22%) de alto riesgo y en solo una paciente (4%) se evidenció el tipo 53 o de probable alto riesgo (Cuadro y Fig. 6).

De 13 pacientes portadoras de NIC I, en 10 (77%) de ellas estaban presentes los VPH de bajo riesgo y en 3 (23%) los de alto riesgo, de 5 pacientes con NIC II, 2 (40%) correspondió al VPH de bajo riesgo y 3 (60%) de alto riesgo. Mientras que aquellas que cursaban con NIC III, solo 1 (20%) se tipificó como de bajo riesgo, en 3 (60%) muestras de alto riesgo y una paciente presentó en tipo 53 o de probable alto riesgo (Cuadro y Fig. 7).

Ingresaron al estudio 3 pacientes con cáncer invasor y en todas (100%) se identificó al VPH de alto riesgo (Cuadro y Fig. 8).

Los resultados de Biología Molecular indican la presencia de una banda de 270 pb para la β globina que fue usada como control positivo y una banda de 250 pb. para la fracción L1 del virus del papiloma humano, una banda de 450 pb para la fracción My del virus del VPH (Fig 9 y 10).

Los cambios citológicos de inflamaciones se presentaron como exudado con células inflamatorias y detritus celulares, hay células con cambios mezclados con abundantes neutrófilos, linfocitos e histiocitos (Fig. 11).

En el extendido celular de los casos de displasia leve o NIC I, se identificaron pocas células anormales, hay alteraciones en el arreglo regular de la tercera parte inferior del epitelio, conservando las otras dos terceras partes su arquitectura normal, las células tienen núcleos grandes e irregulares, pero hay abundante citoplasma (Fig. 12).

Las células características de la infección por VPH corresponden a los coilocitos, hay crecimiento nuclear aparente, cromatina difuminada y un gran halo perinuclear, a menudo hay binucleación (Fig. 13).

Los cambios de la displasia moderada o NIC II, solamente la tercera parte superior del epitelio tuvo caracteres morfológicos normales y las dos terceras partes inferiores estuvieron sustituidas por numerosas células que se disponen en forma desordenada, en los frotis se observaron queratinización y células con lesiones de alto grado (fig. 14).

En el NIC III, la alteración epitelial estuvo presente en todo el espesor del epitelio, las células son profundas y de aspecto inmaduro, con poco citoplasma y frecuentemente binucleadas (fig. 15).

Los frotis con células neoplásicas o carcinoma invasor observaron dichas células en forma de “renacuajo” o células con cola o caudadas, alargadas con un extremo ancho en donde se localiza el núcleo, este se localiza excéntricamente y puede haber diversos grados de queratinización citoplásmica (Fig. 16).

**Determinación de Genotipos del VPH y su Relación con la NIC
en el Hospital General de Querétaro**

Cuadro Núm. 1.- Edad de las pacientes con citologías sospechosas de VPH

Grupos de Edad (años)	n	%
< 20	2	3
20 - 29	19	29
30 - 39	21	32
40 - 49	18	27
50 - 59	4	6
60 ó más	2	3
Total	67	100

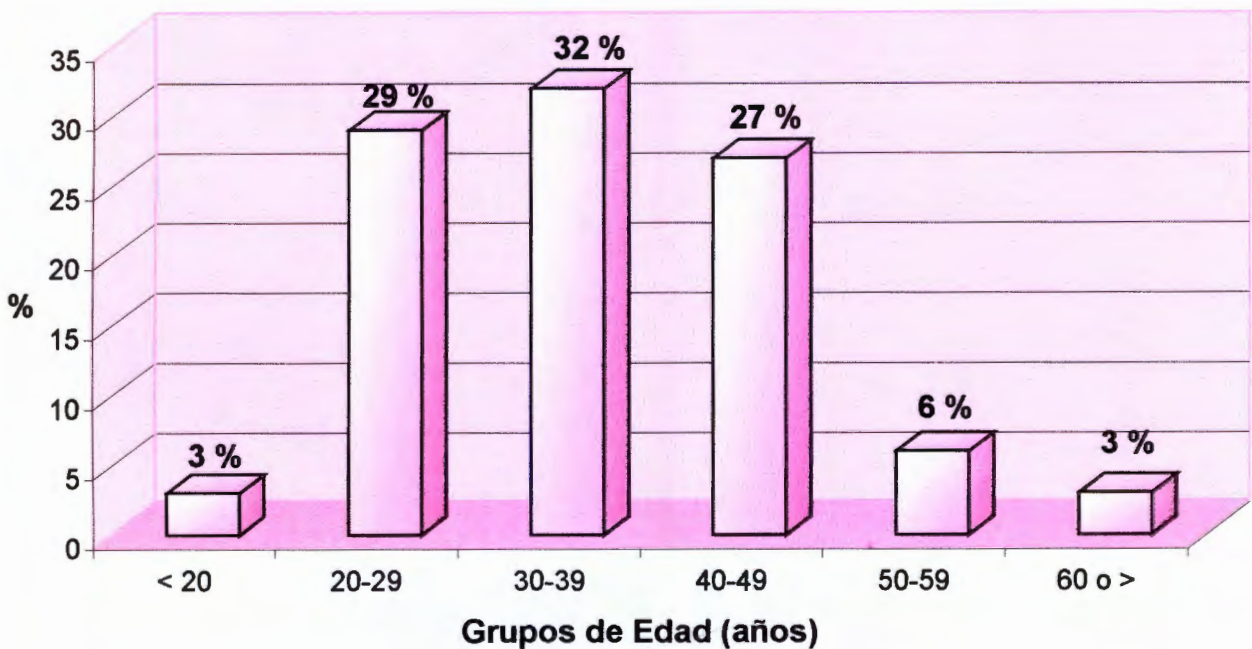


Fig. 1.- Grupos de edad de pacientes con lesiones sospechosas del VPH, que se les realizó la toma para PCR (67 pacientes).- El grupo mas frecuentes correspondió entre los 30 y 39 años.

Fuente: Hoja de datos. Clínica de Displasias del Hospital General de Querétaro

**Determinación de Genotipos del VPH y su Relación con la NIC
en el Hospital General de Querétaro**

Cuadro Núm. 2.- Número de gestas de pacientes con citologías sospechosas de VPH

Número de Gestas	n	%
0 – 1	17	25
2 – 3	16	24
4 – 5	11	16
6 ó más	19	28
Se ignora	4	6
Total	67	100

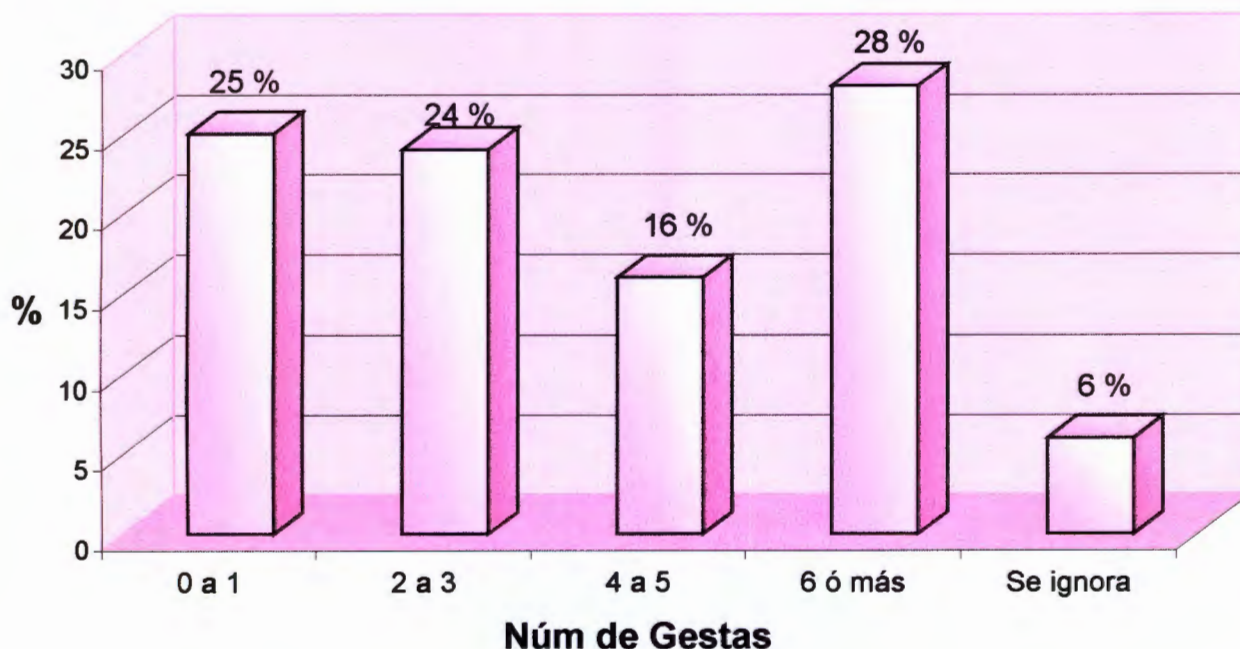


Fig. 2.- Número de gestas de pacientes portadoras de lesiones sospechosas de VPH y que se les realizó PCR. (67 pacientes).- El grupo más frecuente fue aquellas con mas de 6 gestas.

Determinación de genotipos de VPH y su relación con la NIC
en el Hospital General de Querétaro.

Cuadro Núm. 3.- Citologías sospechosas de VPH enviadas a *PCR

Resultados de PCR	n	%
Positivo	41	61
Negativo	26	39
Total	67	100

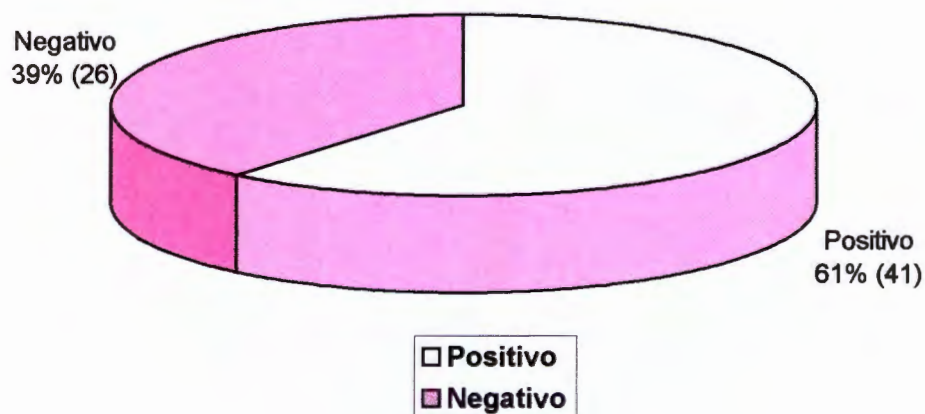


Fig. 3.- Resultados del PCR de las citologías sospechosas del VPH. (67 muestras).- Se observa un 39% de resultados falsos positivos en el diagnóstico de VPH por citología.

Fuente: Hoja de datos. Clínica de Displasias del Hospital General de Querétaro

*Reacción en Cadena de la Polimerasa

**Determinación de Genotipos del VPH y su Relación con la NIC
en el Hospital General de Querétaro**

Cuadro Núm. 4.- Resultados de PCR y lesiones cervicales

Tipo de Lesión	VPH (+)		VPH (-)		Total N (100%)
	N	%	N	%	
Lesión Inflamatoria	15	56	12	44	27
NIC I	13	57	10	43	23
NIC II	5	56	4	44	9
NIC III	5	100	0	0	5
Cáncer Invasor	3	100	0	0	3
Total	41		26		67

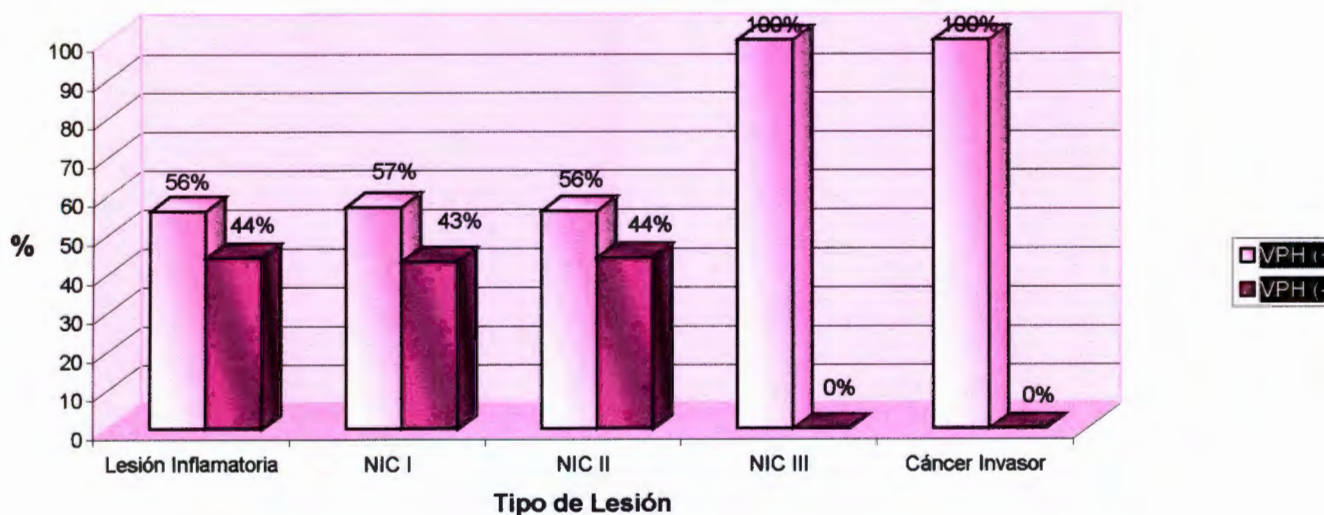


Fig. 4.- Resultados del PCR en relación a los diferentes estadios de lesión cervical.- Se observa que a mayor grado de lesión, más frecuente la infección por el VPH.

Fuente: Hoja de datos. Clínica de Displasias del Hospital General de Querétaro

**Determinación de Genotipos del VPH y su Relación con la NIC
en el Hospital General de Querétaro**

Cuadro Núm. 5.- Muestras positivas por PCR y su clasificación oncogénica*

Clasificación Oncogénica	N	%
Bajo riesgo	21	51
Alto riesgo	18	44
Probable alto riesgo	2	5
Total	41	100

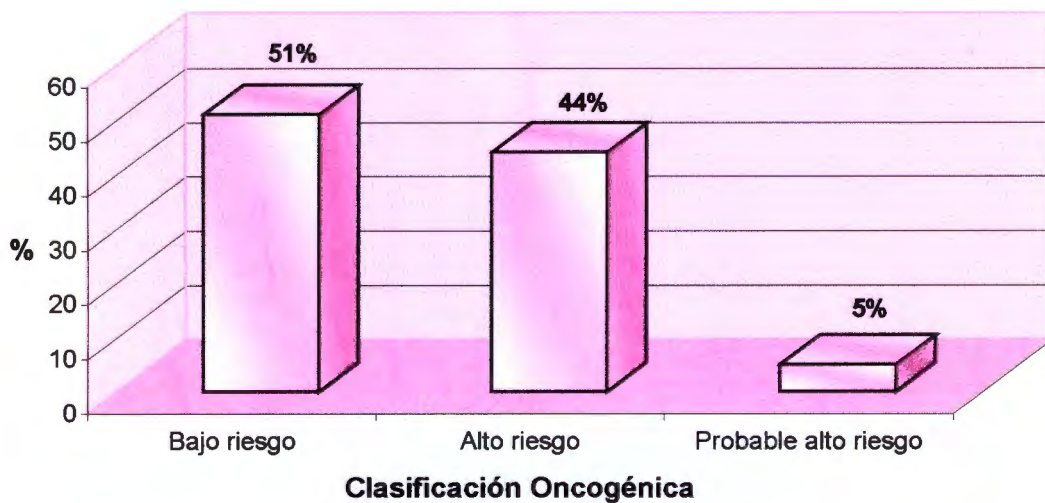


Fig. 5.- Clasificación oncogénica de las muestras positivas por PCR al virus del papiloma humano.- Casi la mitad de las pacientes con algún grado de lesión cervical son portadoras del VPH de bajo riesgo.

Bajo Riesgo: 6,11,40,42,43,44,54,61,70,72
 Alto Riesgo: 16,18,45,31,33,52,58,35,39,51,56,59,68,73,82
 Probable Alto Riesgo: 26,53,66

Fuente: Hoja de datos. Clínica de Displasias del Hospital General de Querétaro

*International Agency for Research on Cancer (2003)

**Determinación de Genotipos del VPH y su Relación con la NIC
en el Hospital General de Querétaro**

Cuadro Núm. 6.- Lesiones inflamatorias y VPH

Tipos de VPH	N	%
Negativo	12	44
Bajo riesgo	8	30
Alto riesgo	6	22
Probable alto riesgo	1	4
Total	27	100

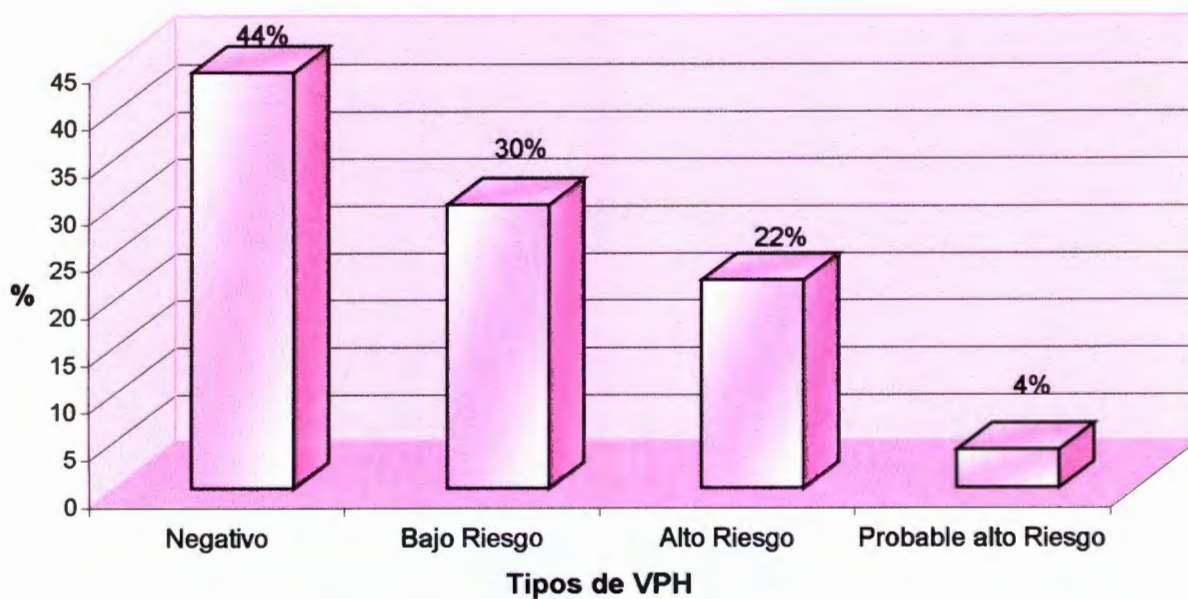


Fig. 6.- Lesiones inflamatorias cervicales y resultados de la PCR (27 muestras). Más de la mitad de las pacientes son portadoras de VPH, en su mayoría de bajo riesgo oncogénico.

Fuente: Hoja de datos. Clínica de Displasias del Hospital General de Querétaro

**Determinación de Genotipos del VPH y su Relación con la NIC
en el Hospital General de Querétaro**

Cuadro Núm. 7.- Neoplasia Intraepitelial Cervical y VPH

Tipo de VPH	NIC I		NIC II		NIC III	
	N	%	N	%	N	%
Bajo Riesgo	10	77	2	40	1	20
Alto Riesgo	3	23	3	60	3	60
Probable Alto Riesgo	0	0	0	0	1	20
Total	13	100	5	100	5	100

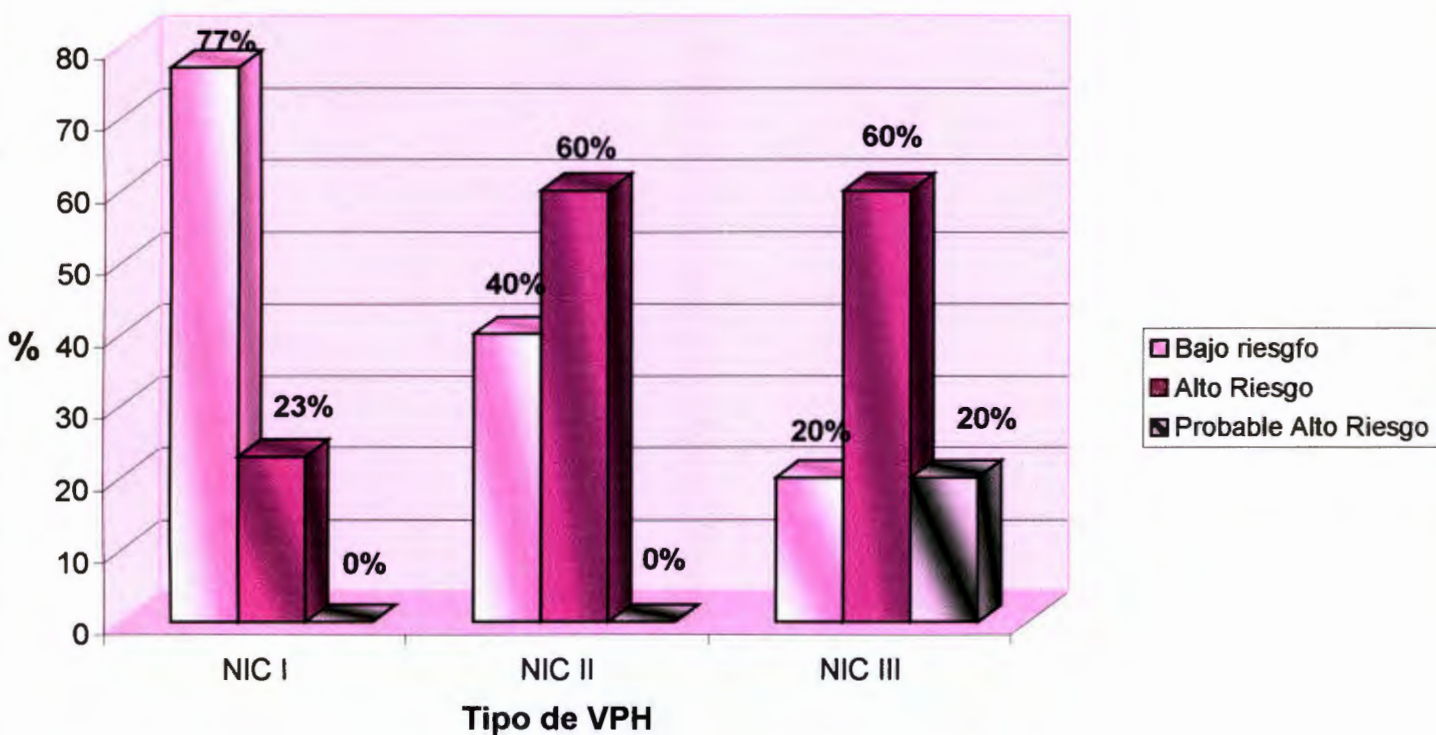


Fig. 7.- Diferentes estadios de NIC y su relación con los genotipos del VPH. A mayor grado de lesión cervical, mayor frecuencia de VPH de alto riesgo.

Fuente: Hoja de datos. Clínica de Displasias del Hospital General de Querétaro

Determinación de Genotipos del VPH y su Relación con la NIC
en el Hospital General de Querétaro

Cuadro Núm. 8.- Cáncer Invasor y VPH

Tipo de VPH	N	%
Bajo Riesgo	0	0
Alto Riesgo	3	100
Probable Alto Riesgo	0	0
Total	3	100

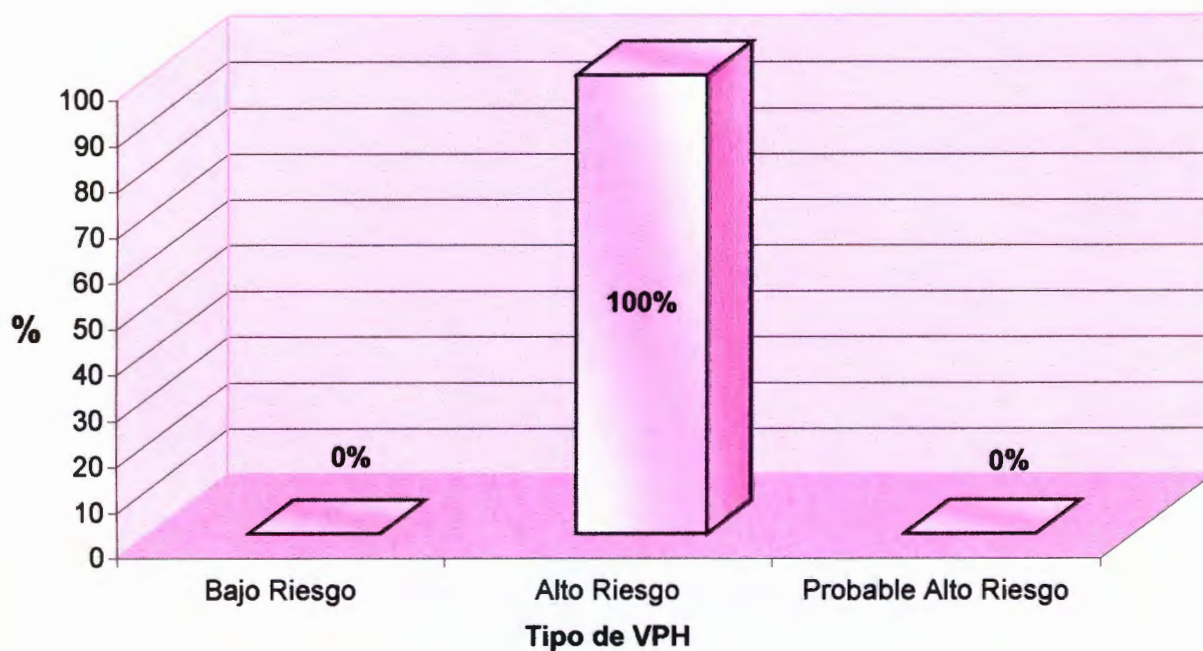


Fig. 8.- Cáncer invasor cervical y genotipo del VPH (3 muestras). La totalidad de las muestras son positivas con VPH de alto riesgo.

Fuente: Hoja de datos. Clínica de Displasias del Hospital General de Querétaro

Determinación de Genotipos del VPH y su relación con la NIC
en el Hospital General de Querétaro

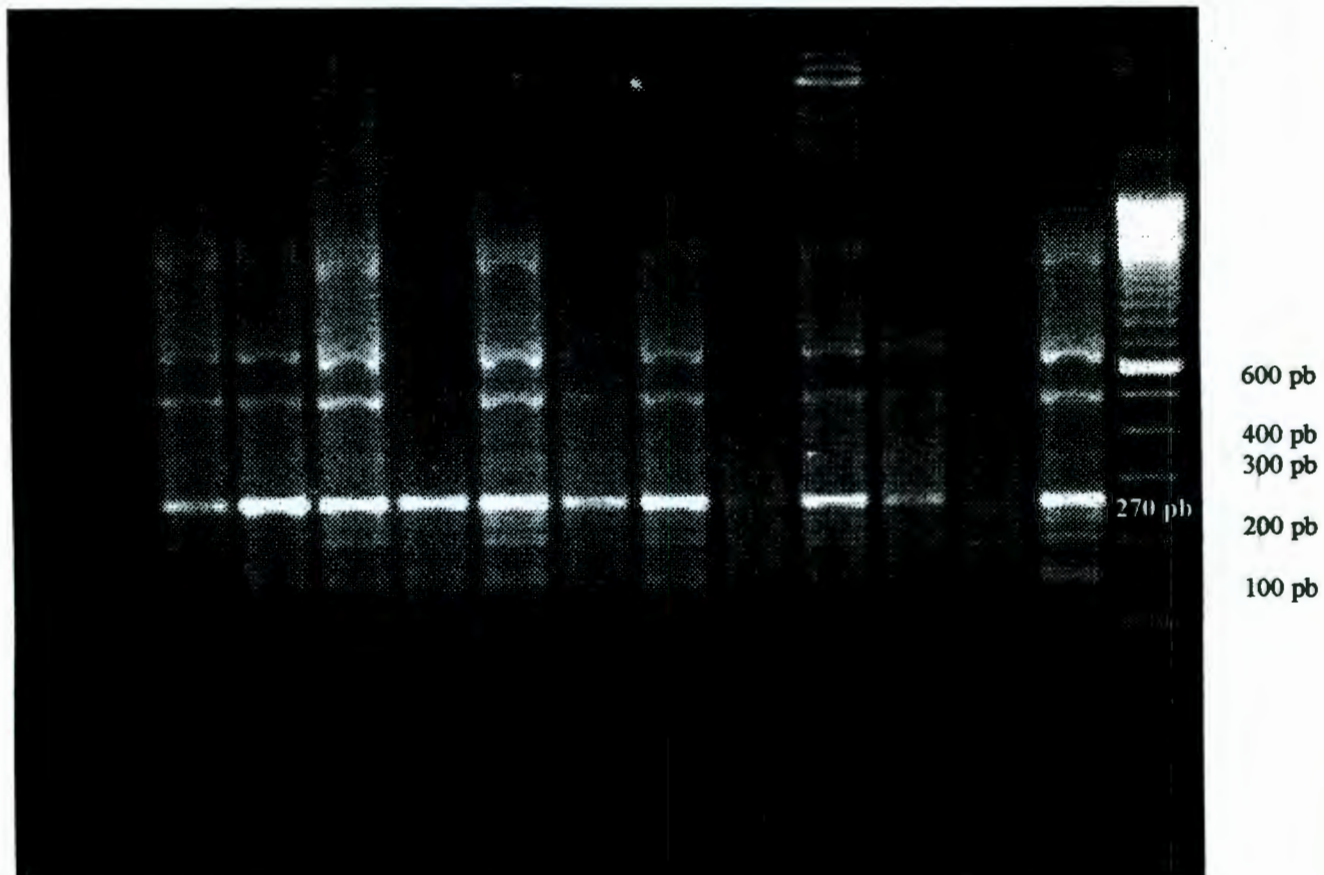


Fig. 9.- Electroforesis de ADN.- Análisis de muestras de DNA amplificadas por PCR en pacientes sospechosas de infección de VPH. En los diferentes carriles se amplifica la región L1 del virus del papiloma humano. En el último carril se presenta el marcador

Determinación de Genotipos del VPH y su relación con la NIC
en el Hospital General de Querétaro

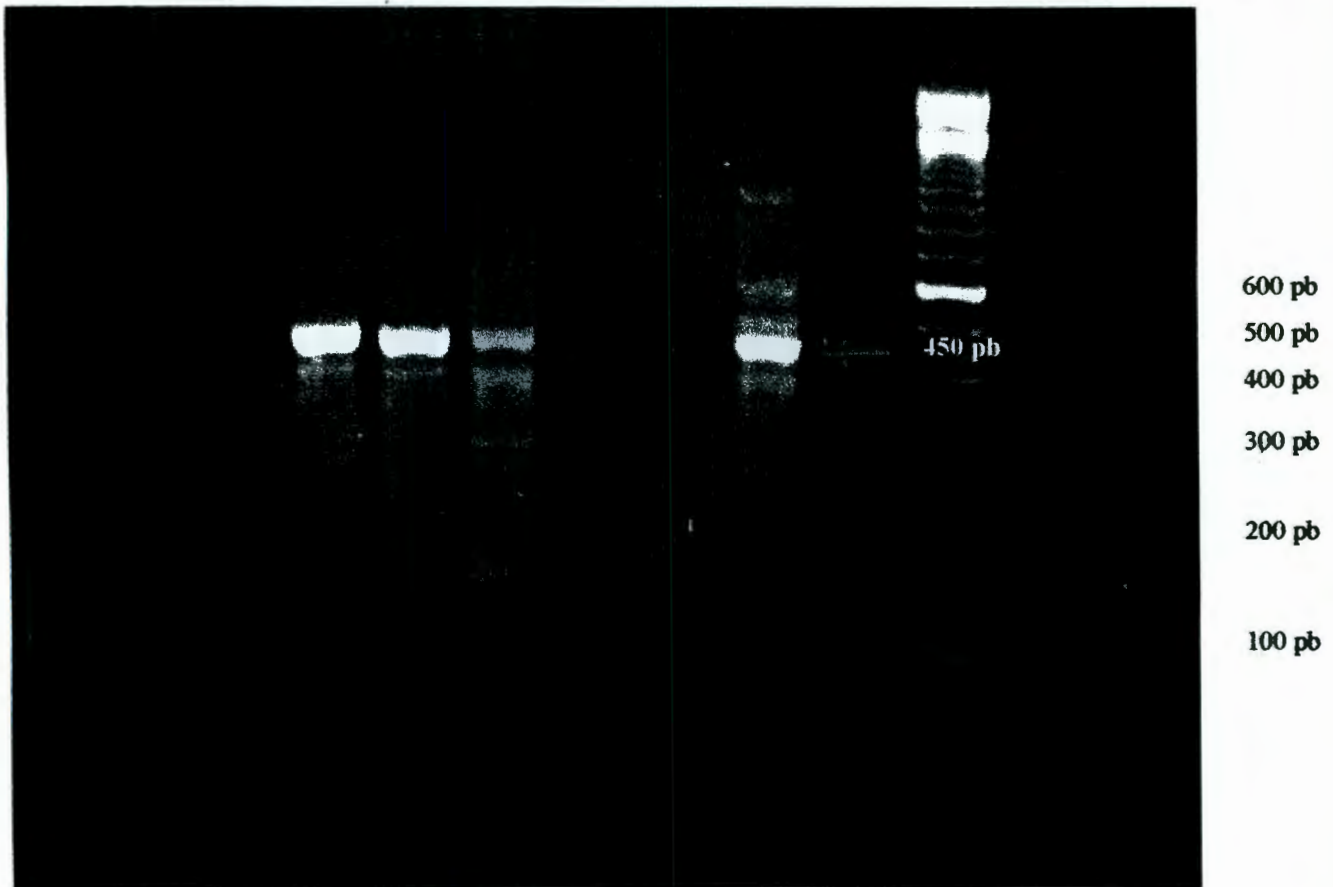


Fig. 10.- Electroforesis de ADN. Ejemplo representativo de los DNAs amplificados por PCR. En los carriles 1,2 y 4 se observa la amplificación de la fracción My de la región L1 del virus del papiloma humano.

Determinación de Genotipos del VPH y su relación con la NIC
en el Hospital General de Querétaro

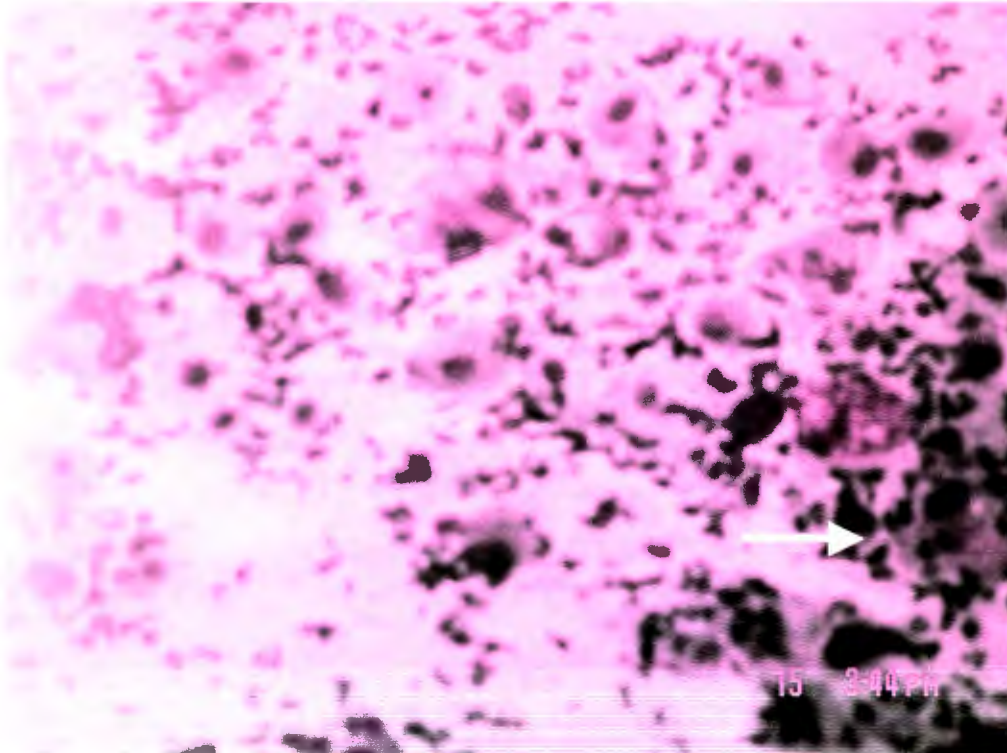


Fig. 11.- Frotis inflamatorio, hay células epiteliales con cambios mezclados con abundantes neutrófilos, linfocitos e histiocitos, se observa también cariorrexis y cariólisis.

Determinación de Genotipos del VPH y su relación con la NIC
en el Hospital General de Querétaro.

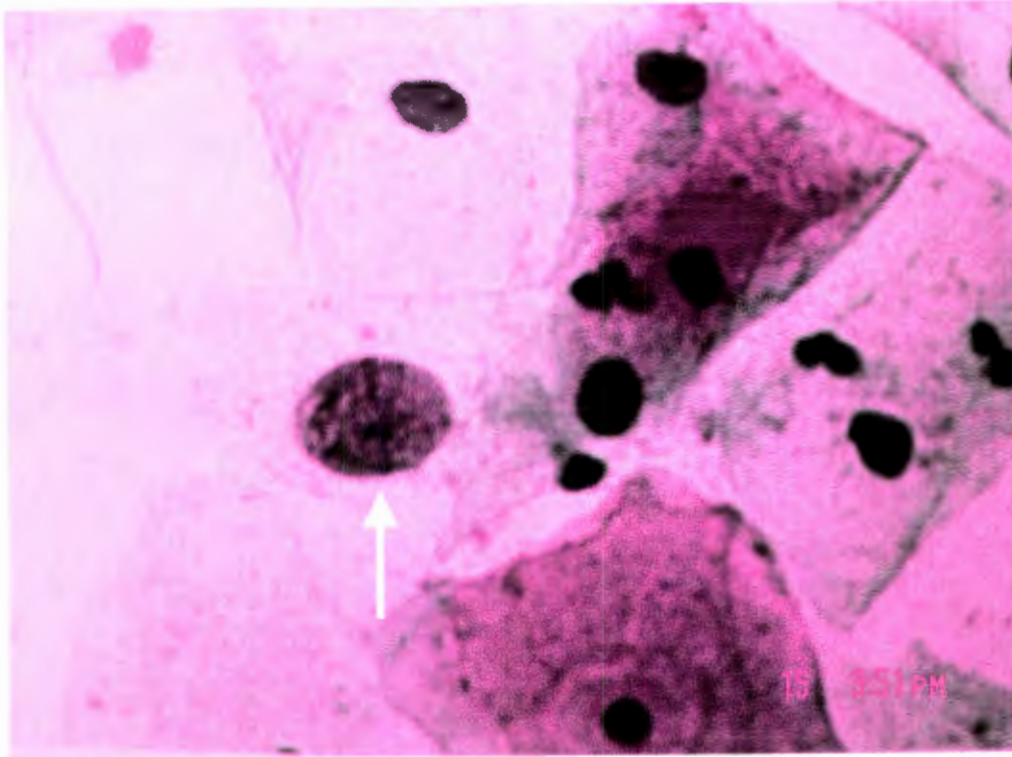


Fig. 12.- Lesión de bajo grado, displasia leve (NIC I); las células tienen núcleos grandes e irregulares, pero hay abundante citoplasma y los cambios nucleares consisten en ligero aumento de su tamaño.

Determinación de Genotipos del VPH y su relación con la NIC
en el Hospital General de Querétaro



Fig. 13.- Koilocitos y células normales sin cambios por la infección viral, los koilocitos son células de estratos intermedios o superficiales, con crecimiento nuclear aparente, cromatina difuminada y un gran halo perinuclear, (flecha) a menudo hay binucleación.

Determinación de Genotipos del VPH y su relación con la NIC
en el Hospital General de Querétaro

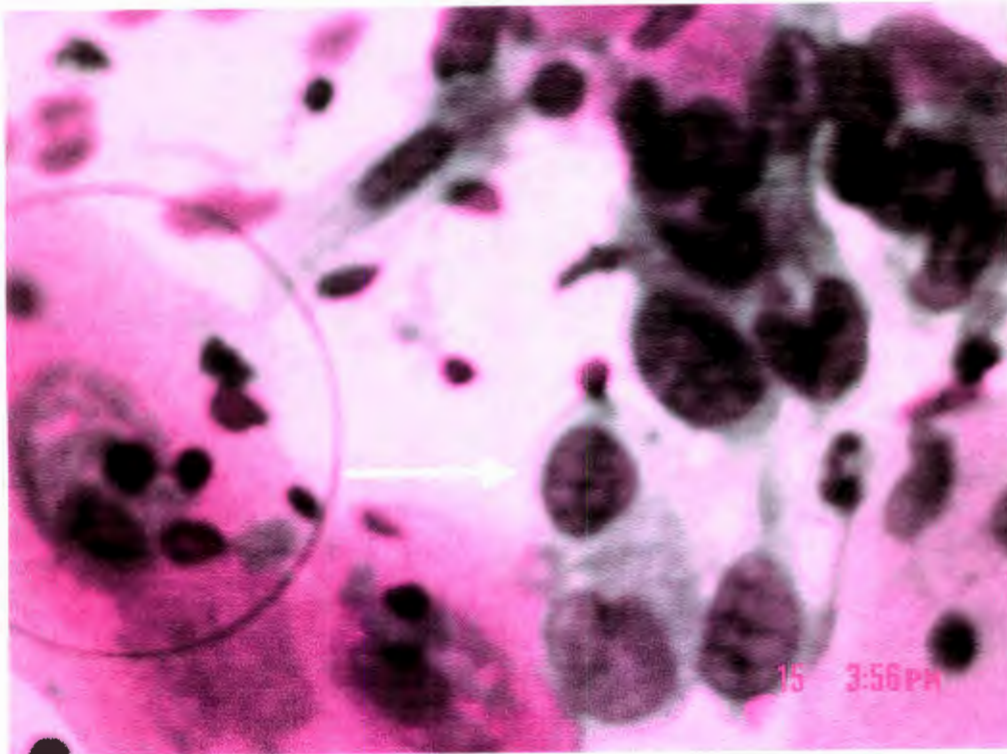


Fig. 14.- Frotis con queratinización, un coilocito abortivo (círculo) y células con lesión de alto grado (NIC II). El citoplasma es cianófilo, los núcleos son grandes, con pérdida de la relación núcleo / citoplasma, ya que esta última disminuye.

Determinación de Genotipos del VPH y su relación con la NIC
en el Hospital General de Querétaro

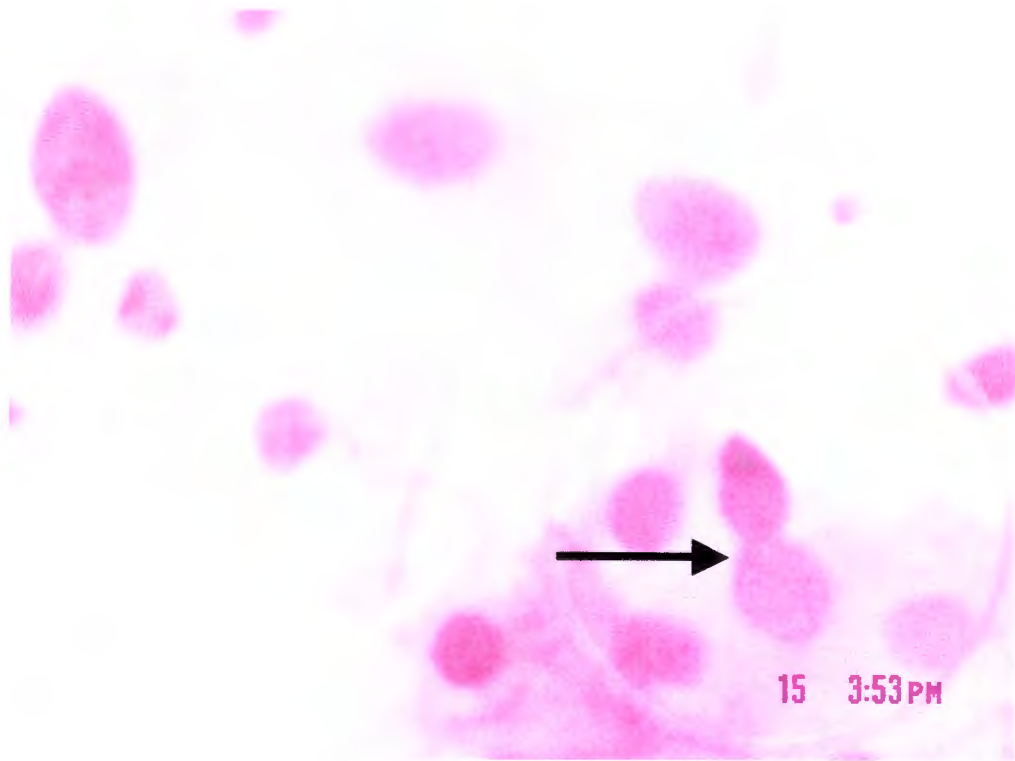


Fig 15.- Lesión de alto grado, (NIC III), hay todavía citoplasma y una célula muestra binucleación (círculo), las células son profundas y de aspecto inmaduro, lo más notorio es la presencia de núcleos de forma y tamaño irregular, aneuploides.

Determinación de Genotipos del VPH y su relación con la NIC
en el Hospital General de Querétaro

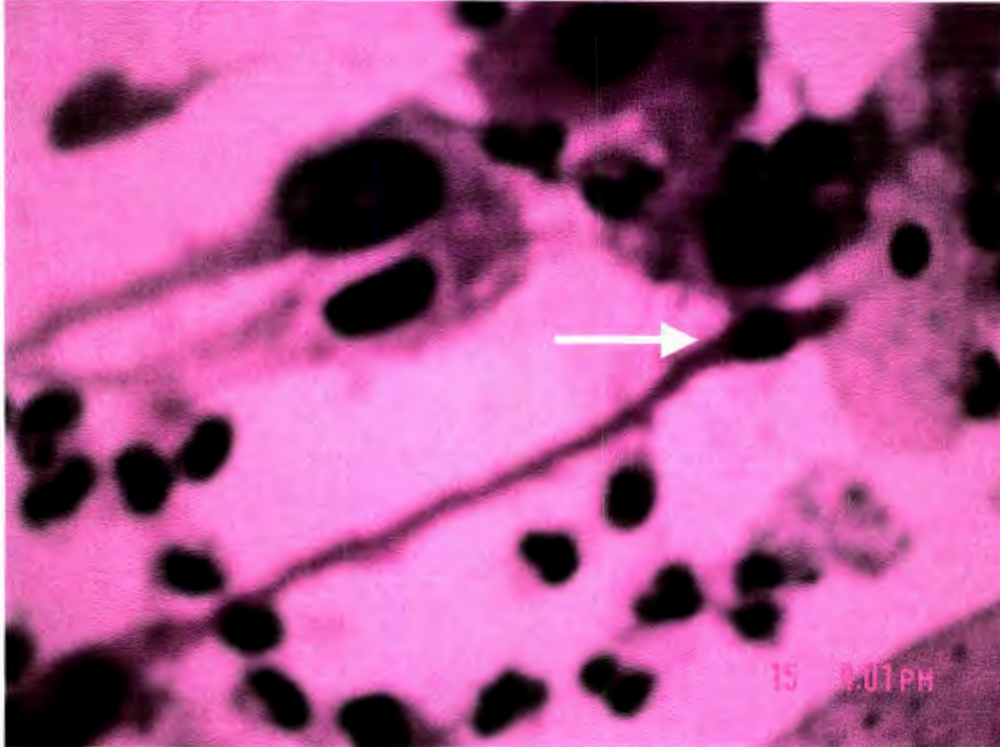


Fig. 16.- Células de carcinoma invasor con alargamiento citoplásmico que le confiere el aspecto de renacuajo, el núcleo se localiza excéntricamente y hay diversos grados de queratinización citoplásmica.

V.- DISCUSIÓN

En el presente estudio, se tomaron 81 muestras para PCR, de pacientes que acudieron a la clínica de displasias del Hospital General de Querétaro y del Hospital de especialidades del Niño y la Mujer de la SESEQ, con citologías (papanicolau) sospechosas de infección por el virus del papiloma humano, de las cuales se eliminaron 14 (17%) por presentar exceso de moco, desecación o contaminación de la muestra y no fue posible terminar el estudio, uno de los principales inconvenientes de esta técnica es su alta sensibilidad a agentes externos y partículas biológicas como lo reporta Espinoza y col. en 1993, entre otros autores.

De las 67 muestras donde se realizó el estudio del PCR, el promedio de edad fue de 36.4 años y más frecuentes en el grupo de los 30 a 39 años con 6 o más embarazos, esto debido tal vez, a que en esos grupos de edad, es cuando acuden más frecuentemente a la toma del papanicolau y hay más conciencia en la población femenina acerca de las diferentes medidas preventivas en salud, y no exactamente porque a esta edad sea mas frecuente la infección por el VPH, que según diferentes autores se presenta en mujeres mas jóvenes de entre los 15 y 30 años de edad (De la Torre 1994, Cano 1995). lo anterior nos habla que se deben incrementar los programas oficiales de detección de enfermedades de transmisión sexual en aquellos grupos más vulnerables como son las adolescentes y adultas jóvenes, así como los de detección oportuna del cáncer cérvico uterino.

En el grupo de estudio donde se realizó el procesamiento de PCR, de las 67 muestras sospechosas citológicas de infección viral, solo 41 (61%) resultaron positivas al ADN que codifica para el virus papiloma humano , es decir el 39% fueron falsas positivas, lo cual indica que se abusa de los hallazgos citológicos sugestivos de la infección (presencia de Koilocitos, caracterizados por una gran zona perinuclear y a menudo binucleación) (Torne 1997), estos indicios son sugestivos solamente de la infección y necesitan de la confirmación por las diferentes técnicas de Biología Molecular, se ha observado que cuando se combinan ambos métodos aumenta ostensiblemente la sensibilidad en comparación de ambas técnicas por separado (Hans y Sonia 1994), con los

resultados obtenidos en este trabajo apoyan fuertemente la utilidad de la técnica PCR para detectar el ADN del VPH en mujeres con sospecha citológica de infección y que promete ser de gran utilidad en el protocolo de identificación y manejo de las pacientes portadoras de infección como se reporta en la literatura internacional (Berumen 1994).

La prevalencia de infección por VPH en las pacientes que tenían lesiones inflamatorias en el papanicolau fue del 56%, estos resultados concuerdan con la mayoría de los estudios epidemiológicos donde indica una prevalencia que va desde el 11% hasta un 80%, dependiendo del tipo de población que se trate (Zamora 1998, Hernández 2002) en este estudio todas las pacientes referidas presentaban algún tipo de lesión en el epitelio cervical.

En las pacientes con algún grado de NIC (I a III) la prevalencia de infección fue del 62% , cifra menor a la reportada en la literatura (Hernández 2002) donde se ha encontrado en el 80 a 90% de los casos de NIC, esto quizá debido a que en las series reportadas, en su mayoría correspondían a grados avanzados del NIC: al agrupar por diferentes grados de lesión, se observó que en NIC I y NIC II la prevalencia de infección fue similar con un 57% y 56% respectivamente, sin embargo en el NIC III y cáncer invasor todas las pacientes fueron portadoras de infección, lo cual nos habla de la importancia de la presencia de virus como causa necesaria en la etiopatogenia del cáncer (Moscicki 1989). La alta prevalencia del VPH en pacientes con NIC III y cáncer cervical invasor, apoyan la hipótesis de estas patologías como padecimientos de transmisión sexual con fuerte componente infeccioso (Guijón 1985) y al virus del papiloma humano como el factor asociado más importante (Ramírez 1989 y Lizano 1997).

En el presente estudio se adoptó esta última clasificación y se encontraron 41 muestras positivas de pacientes con lesiones cervicales, de las cuales el 51% correspondieron a los de bajo riesgo y el 44% de alto riesgo, al clasificar la patología cervical de acuerdo al grado de lesión, en pacientes con inflamación cervical y VPH positivo, el 40% presentó VPH de alto riesgo, esto es particularmente importante en la detección de aquellas mujeres que potencialmente pueden desarrollar un cáncer cervical en

un futuro mediato, sobre todo si se agregan los cofactores como tabaco, sexo, cervicitis, trauma cervical, inmunidad deficiente, edad y algún otro cofactor desconocido, por lo que no basta con tener una citología sospechosa de infección de VPH y datos inflamatorios, los cuales son frecuentes en la población general, en estos casos es necesario tipificar al virus y de encontrar el VPH de alto riesgo, implementar medidas suplementarias y efectuar un seguimiento más estrecho en estas pacientes (Toledo y García 1996).

El cáncer cervical está precedido de una serie de alteraciones celulares en el epitelio denominada Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), a mayor grado de NIC se ha observado mayor prevalencia de infección, particularmente los de alto riesgo, lo cual apoya fuertemente esta asociación (Buckley y Butler 1982), en el presente estudio se pudo corroborar esta hipótesis, mientras que en el NIC I la frecuencia de VPH de alto riesgo fue del 23%, en el NIC II se incrementó al 60%, en el NIC III se conservó el 60% de alto riesgo, pero se incrementó la frecuencia de los de probable alto riesgo en un 20% del total de infección, probablemente en el futuro habrá que reclasificar a este grupo, e integrarlos como de alto riesgo. En relación a los 3 casos de cáncer cervical que se presentaron, todos resultaron positivos a la infección de VPH de alto riesgo, de acuerdo a lo publicado por Keng en 1996, donde se menciona una prevalencia del 95 al 99%.

Nuestro análisis de la presente investigación en mujeres con lesiones cervicales y datos sugestivos de infección por VPH que acudieron a la clínica de displasias del Hospital General de Querétaro y del Hospital de Especialidades del Niño y la Mujer de la SESEQ, proporcionan argumentos robustos del papel que juega la infección por VPH en la etiología de cáncer cervical, y de la necesidad de tipificar el grado de oncogenicidad del virus para identificar las pacientes con altas probabilidades de desarrollar neoplasia malignas cervicales.

VI.- CONCLUSIONES.

El promedio de edad de las pacientes que ingresaron al estudio por ser portadoras de citología sospechosa de infección y que se les realizó la prueba para detección del ADN de VPH por la técnica de reacción de la polimerasa en cadena fue de 36.4 años con una D.E. de 11.05. y un rango de edad entre los 19 y 77 años. El grupo de edad más frecuente fue entre los 30 y 39 años, con 6 o más embarazos.

De las 67 muestras sospechosas de infección citológica de VPH y que se les efectuó la prueba de PCR, se encontró que en un 39% no se amplificó el ADN del virus.

En las pacientes con lesiones cervicales inflamatorias la prevalencia de infección por VPH fue del 56%; el tipo de virus predominante fueron los de bajo riesgo con un 53%.

Aquellas mujeres portadoras de NIC I, la prevalencia fue del 57% con un 77% tipificados como bajo riesgo. En las muestras con NIC II, la prevalencia de infección fue del 56%, predominando los de alto riesgo con 60%. En los casos de NIC III el 100% de las muestras fueron positivas y de alto riesgo.

En todas las pacientes portadoras de cáncer cervical invasor se encontró infección por VPH de alto riesgo.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que hubo una correlación entre el mayor grado de lesión cervical y la frecuencia de la infección por el VPH, igualmente a mayor grado de lesión, es más frecuente encontrar los virus de alto riesgo.

La aplicación de la técnica de PCR junto a la citología cervical es más efectiva que la citología cervical sola para identificar aquellas pacientes portadoras de infección por VPH y con alto riesgo de presentar en el futuro cáncer cérvico uterino, lo cual nos permitirá realizar oportunamente medidas preventivas y disminuir la elevada mortalidad por esta causa.

VII.- LITERATURA CITADA.

Berumen, J. Casas, L y Segura, E. (1994). Genome amplificación oh human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retención of E1 / E2 genes. *Int. J. Cáncer*. **56**: 640-645.

Berumen, J. , Miranda E. , Zafra G. (1997) . Epidemiología molecular de cánceres de alta incidencia en México. *Gac. Méd. Méx.* **133** : (1) 35-41.

Berumen, J. y Villegas, N. (1997). Vacunas terapéuticas recombinantes contra el cáncer del cuello uterino. *Salud Pública Mex.* **39**: 288-29.

Buckley, C. , Butler E. (1982). Fox H. Cervical intraepithelial neoplasia. *J. Clin. Pathol.* **35**: 1-13.

Cano, G. (1995). Conceptos actuales sobre la infección por virus del papiloma humano. *Ginec. Obst. Mex.* **63**: 509-512.

Castañeda, I. (1998). Factores de riesgo para cáncer cervicouterino en mujeres de Zacatecas. *Salud Pública de México.* **40** : (4): 330-338.

De la Torre, D. Rosales E. Mora T. (1994). Correlación entre variables ginecoobstétricas con lesiones morfológicas por virus del papiloma humano premalignas y malignas del cervix uterino. *Rev. Inst. Nal. Cancerol.* **40** : (2): 76-80.

Espinosa, M. (1993). Reacción de polimerasa en cadena (PCR) en el diagnóstico clínico. Revisión del uso de la técnica. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* **35**: 225-230.

Garfias, C. , Villarreal, P. , Juárez, A. (1995). Conceptos actuales sobre la infección por virus del papiloma humano. *Rev. Ginec. Obst. Mex.* **63**: 509-512.

Gerard, J. Nuovo, R. (1989). Papilomavirus humano: Una revisión. *Year Boosk de Obstetricia y Ginecología*. Edit. Panamericana.

González, J. , Chavez, J. , Hernández, D. , Martinez, S. , García, A. (2002), Infección por virus del papiloma humano de alto y bajo riesgo en mujeres con NIC. Características diferenciales. *Ginec. Obstet. Ginecol* ; 70: 11-16.

Guijón, M. , Paraskevas, M. , (1985). Asociati3n of sexually transmitted disease with cervical intraepithelial neoplasia: a Case – control study. *Am. J. Obstet. Ginecol*. 151: 185 –90.

Hans, B. Krebs, M. 1989. editor, Infecci3n genital por papiloma virus humano. *Clin. Obst. Ginec*. 1/. ed, Interamericana. 89-91.

Hans, B. y Sonia, M. (1994). Human papillomavirus infections an genital tract cancers. *Gynecology and Obstetrics*. 4: 1040 Edition John J.Sciarra. JB Lippincott Company.

Hernández, D. , García, A. , Guido, M. , González, J. , Cruz, F. , Apresa, T. , Martinez, O. , Ornelas, L. , (2002). Virus de papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) y neoplasia intraepitelial cervical (NIC) en mujeres de dos hospitales de la Ciudad de México. *Rev. Invest. Clin*. 54 : (4): 299-306

Keng Ling, C. y Anders, H. (1996). Persistencia of human papillomavirus (HPV) infections preeeding cervical carcinoma. *Cáncer*. 77: 121-127.

Lazcano, P. , Hernández, A. , López, C. , Alonso, D. , Tornos, L. (1995). Factores de riesgo reproductivo e historia de vida sexual asociados a cáncer cervical en México. *Rev. Invest. Clin*. 47: (5): 377-385.

Lizano, G. y García, A. (1997). Molecular variants of human papillomavirus types 16, 18 and 45 in tumors of the uterine cervix in México. *Gac. Med. Mex.* **133** : (1) : 43-8.

Lizano, M. Berumen, J. y Guido, M. (1997). Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J. Nat. Cáncer Inst.* **89**: (16) : 1227- 231.

Moscicki, A. , Winkler, B. , Irwin C. y Schachter J. Difference in biologic maturation, sexual behavior and sexually transmitted disease between adolescents with and without cervical intraepithelial neoplasia. *J. Pediatric* 1089; **115** : 487 – 93.

Muñoz, N. , Bosch, F. , San José. S. , Herrero. R. , Castellsage, X. , Shah , K. , Snijders, P. y Meijer, C. (2003). Clasificación epidemiológica de los tipos de papiloma virus humanos asociados con cáncer cervical. International Agency for research on cancer. Multicenter Cervical cancer Study Group. *N. Engl. J. Med.* **348**: 518-27.

Novoa, A. y Echegollen, A. , (2001). Epidemiología del cáncer de cervix en Latinoamérica. *Ginec. Obstet. Mex.* **69**: 243-246.

Ramirez, G. , Luévano, F. y Mora T. (1989). Carcinoma cervico uterino. *Rev. Inst. Nat. Cancerol.* **33** : (3): 417 – 439.

Reeves, W. Raels W. Briton L. (1989). Epidemiology of genital papilloma virus and cervical cancer. *Reviews of infectious diseases.* **3**: 426-439.

Richard, R (1987) Papiloma virus humano. *Clin. Obstet. Ginec.* Temas actuales 2/ Editorial Interamericana.

Syrjanen K. (1980). Condylomatous epithelial changes in the uterine cervix and their relationship to cervical carcinogenesis. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **7**: 415 – 420.

Taja, C. , Salcedo V. y Osornio, V. (1996). Presencia de la proteína tardía del virus del papiloma humano en tejido cervicouterino con lesiones de bajo y alto grado de malignidad. *Rev. Inst. Cancerol.* **42** : (4): 181 – 187.

Toledo, C. y García C. (1996). La proteína P53 y los oncogenes de papiloma virus humano en la carcinogénesis del cuello uterino. *Rev. Invest. Clin.* **48**: 59 – 68.

Vargas, H. (1996). Virus del papiloma humano. Aspectos epidemiológicos, carcinogénicos, diagnósticos y terapéuticos. *Rev. Ginec. Obst. Mex.* **64**: 411 – 417.

Zamora, P. y Terrés, S. (1998). Infección por virus del papiloma humano en mujeres y hombres mexicanos. Identificación por el sistema de captura de híbridos. *Rev. Mex. Patol. Clin.* **45**: 9 – 15.

VIII.- DATOS DE IDENTIFICACIÓN

VIII. 1.- DE LOS INVESTIGADORES

MED. ESP. GENARO VEGA MALAGÓN
INVESTIGADOR

DRA. GUADALUPE ALCOCER GARCÍA
DIRECTOR DE TESIS

DR. GINO NORIS GARCIA
ASESOR TECNICO

IX.- FIRMAS DE LOS INVESTIGADORES

**INVESTIGADOR
MED. ESP. GENARO VEGA MALAGÓN**

**DIRECTOR DE TESIS
DRA. GUADALUPE ALCOCER GARCÍA**

X.- ANEXOS.

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

1.- FICHA DE IDENTIFICACIÓN.

NOMBRE.-----

No.. DE EXP.-----

DOMICILIO-----

EDAD -----

2.- ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES ONCOLÓGICOS.

SI----- NO -----

3.- EDAD DE LA MENARQUIA-----

4.- ANTEC. OBSTETRICOS. G. ----- P ----- A ----- C -----

-

5.- INICIO DE VIDA SEXUAL ACTIVA -----

6.- COMPAÑEROS SEXUALES UNO ----- DOS O MAS -----

7.- LESIONES CERVICALES PREINVASORAS

NIC I ----- NIC II ----- NIC III -----

8.- HALLAZGOS SUGESTIVOS DE INFECCIÓN POR VIRUS PAPILOMA HUMANO

COLPOSCOPICOS----- CITOLOGICOS ----- HISTOPATOLÓGICOS-

9.-RESULTADOS INFECC. POR V.P.H. (REACCION EN CADENA DE

POLIMERASA) POSITIVO ----- NEGATIVO -----

10.- GENOTIPO DEL V.P.H. -----



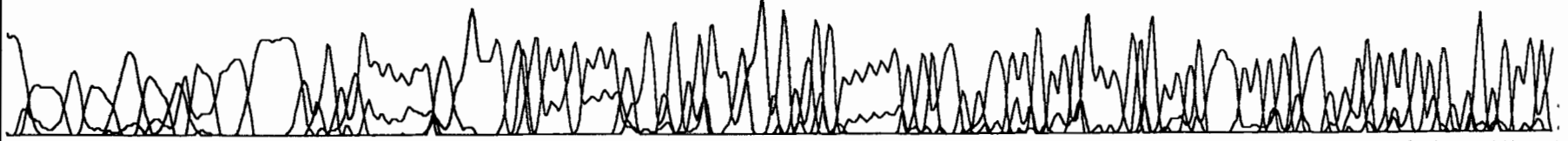
Model 310 136GV8-13-03-9-41 PM.ab1
Version 3.7
Basecaller-310POP4.bcp136GV
BC 1.3.0.0 Cap 5

Signal G:643 A:960 T:875 C:328
DT310POP4{BDV3}v1.mob
BD v3 Matrix.mtx
Points 1741 to 5975 Pk 1 Loc: 1741

Page 1 of 1
Thu, Jan 29, 2004 12:49 PM
Wed, Aug 13, 2003 9:41 PM
Spacing: 10.04{10.04}

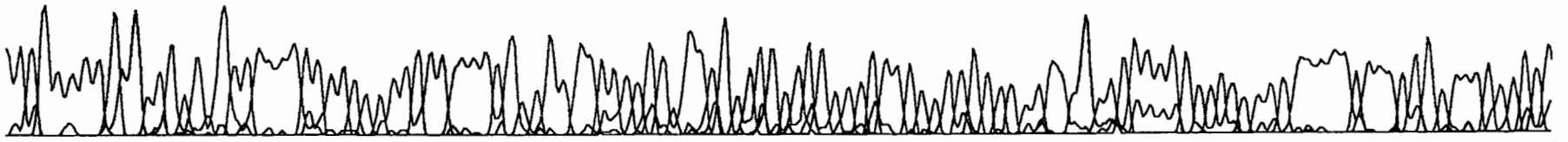
C T T A A T N A C T T C C A A A G T G T A T T T T T A G G G G N C T T C T T A G G T G C T G G A G G T G A T G T T T T G A C A G C A T T G C C T G G G A T G T T A C A A A C C T A T A A G T A T C T T C T A G T G T G C C T C

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110



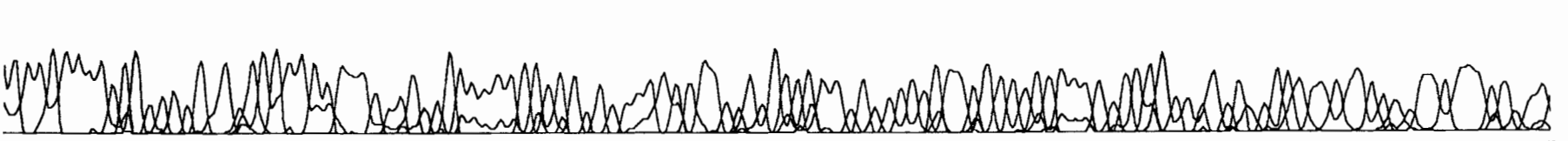
C T G G G G G A G G T T G T A G A C C A A A A T T C C A G T C C T C A A A A T A G T G G A A T T C A T A G A A T G T A T G T A T G T C A T A A C G T C T G C A G T T A A G G T T A T T T G C A C A G T T G A A A A T A A A C T G T A A A T C A T A T

120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 24



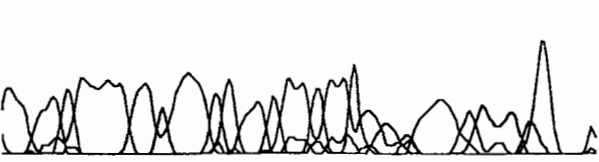
T C C T C C C C A T G T C G T A G G T A C T C C T T A A A G T T A G T A T T T T A T A T G T A G T T T C T G A A G T A G A T A T G G C A G C A C A T A A T G A C A T A T T T G T A C T G C G T G T A T C A A C A A C A G T A A C A A A T A G T T T

0 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360



G T T A C C C C A C A A A T G C C A T T A T T A T G N O C C C T G N G C A A N A

370 380 390 400



4 (310303) Genaro Vega

AATTCTTAATTNCTTCCAAAGTGTTTTTTTAGGGGNCTTCTTTAGGTGCTGGAGGTGTATGTTTTTGACAGCATTGCCTG
GGATGTTACAAACCTATAAGTATCTTCTAGTGTGCCTCCTGGGGGAGGTTGTAGACCAAAATTCAGTCCTCCAAAATAG
TGGAATTCATAGAATGTATGTATGTCANAACGTCTGCAGTTAAGGTTATTTTGCACAGTTGAAAAATAAACTGTAAATCA
TATTCCTCCCCATGTCGTAGGTACTCCTTAAAGTTAGTATTTTTATATGTAGTTTCTGAAGTAGATATGGCAGCACATAA
TGACATATTTGTA CTGCGTGTAGTATCAACAACAGTAACAAATAGTTGGTTACCCCAACAAATGCCATTATTATNNTCCC
TGTGCA

Human papillomavirus type 16 L1 gene, complete cds
Length = 1518

Score = 672 bits (339), Expect = 0.0
Identities = 355/358 (99%), Gaps = 2/358 (0%)
Strand = Plus / Minus

Query: 37 cttctttaggtgctggaggtgtatgtttttgaca-gca-ttgcctgggatgttaciaaacc 94
|||||
Sbjct: 1315 cttctttaggtgctggaggtgtatgtttttgacaagcaattgcctgggatgttaciaaacc 1256

Query: 95 tataagtatcttctagtgctgcctcctgggggaggtttagacccaaaattccagtcctcca 154
|||||
Sbjct: 1255 tataagtatcttctagtgctgcctcctgggggaggtttagacccaaaattccagtcctcca 1196

Query: 155 aaatagtggaattcatagaatgtatgtatgtcanaacgtctgcagttaaggttattttgc 214
|||||
Sbjct: 1195 aaatagtggaattcatagaatgtatgtatgtcataacgtctgcagttaaggttattttgc 1136

Query: 215 acagttgaaaaataaaactgtaaatcatattcctccccatgtcgttaggtactccttaaagt 274
|||||
Sbjct: 1135 acagttgaaaaataaaactgtaaatcatattcctccccatgtcgttaggtactccttaaagt 1076

Query: 275 tagtatttttatatgtagtttctgaagtagatatggcagcacataatgacatattttgtac 334
|||||
Sbjct: 1075 tagtatttttatatgtagtttctgaagtagatatggcagcacataatgacatattttgtac 1016

Query: 335 tgcgtgtagtatcaacaacagtaacaaatagttggttaccccaacaaatgccattatt 392
|||||
Sbjct: 1015 tgcgtgtagtatcaacaacagtaacaaatagttggttaccccaacaaatgccattatt 958

136 genaro

1061411617-1624-761137.BLASTQ3

```
CTTAAATNACTTCCAAAGTGTATTTTTTAGGGGNCCTTCTTTANGTGCTGGAGGTGTATGTTTTTGACAAGCATTGCCTGG
GATGTTACAAACCTATAAGTATCTTCTAGTGTGCCCTCTGGGGGAGGTGTAGACCAAAATTCAGTCCCTCCAAAATAGT
GGAATTCATAGAATGTATGTATGTCATAACGCTGCGAGTTAAGGTTATTTTGCACAGTTGAAAAATAAACTGTAAATCAT
ATTCTCCCCATGTCGTAGGTACTCCTTAAAGTTAGTATTTTTATATGTAGTTTCTGAAGTAGATATGGCAGCACATAAT
GACATATTTGTAAGTGTAGTATCAACAACAGTAACAAAATAGTTGGTTACCCCAACAAATGCCATTATTATGNNCCCT
GGGCAA
```

Human papillomavirus type 16 isolate 16W12E, complete genome
Length = 7904

Score = 696 bits (351), Expect = 0.0
Identities = 374/380 (98%), Gaps = 3/380 (0%)
Strand = Plus / Minus

Query: 15 aaagtgtatTTTTtagggg--cttctttangtgctggaggtgtatgTTTTtgacaagca 72
|||||
Sbjct: 6973 aaagtgtatTTTTaaggggatcttctttaggtgctggaggtgtatgTTTTtgacaagca 6914

Query: 73 -ttgcctgggatgttataaacctataagatcttctagtgctcctcctgggggaggttgt 131
|||||
Sbjct: 6913 attgcctgggatgttataaacctataagatcttctagtgctcctcctgggggaggttgt 6854

Query: 132 agacaaaattccagtcctccaaaatagtgggaattcatagaatgtatgtatgtcataacg 191
|||||
Sbjct: 6853 agacaaaattccagtcctccaaaatagtgggaattcatagaatgtatgtatgtcataacg 6794

Query: 192 tctgcagttaaggttattttgcacagttgaaaaataaactgtaaactcatattcctcccca 251
|||||
Sbjct: 6793 tctgcagttaaggttattttgcacagttgaaaaataaactgtaaactcatattcctcccca 6734

Query: 252 tgtcgtaggtactccttaaagtttagtatttttatatgtagtttctgaagtagatatggca 311
|||||
Sbjct: 6733 tgtcgtaggtactccttaaagtttagtatttttatatgtagtttctgaagtagatatggca 6674

Query: 312 gcacataatgacatatttgtactgctgttagtatcaacaacagtaacaaatagttgggta 371
|||||
Sbjct: 6673 gcacataatgacatatttgtactgctgttagtatcaacaacagtaacaaatagttgggta 6614

Query: 372 ccccaacaaatgccattatt 391
|||||
Sbjct: 6613 ccccaacaaatgccattatt 6594