

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN Y DETECCIÓN DE TIPOS
ONCOGÉNICOS DEL VPH POR TECNOLOGÍA DE CAPTURA DE
HÍBRIDOS EN MUJERES SIN APARENTES FACTORES DE RIESGO**

POR

DR. DAVID DE LA FUENTE VILLARREAL

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN MEDICINA**

MAYO 2008

**EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN Y DETECCIÓN DE TIPOS
ONCOGÉNICOS DEL VPH POR TECNOLOGÍA DE CAPTURA DE
HÍBRIDOS EN MUJERES SIN APARENTES FACTORES DE RIESGO.**

Aprobación de la tesis:

**Dr. med. Oscar de la Garza Castro
Director de la tesis**

**Dr. med. Santos Guzmán López
Co-Director de la tesis**

**Dr. med. Oscar Vidal Gutiérrez.
Miembro del Jurado**

**Dr. med. Norberto López Serna
Miembro del Jurado**

**Dr. med. Abel Guzmán López
Miembro del Jurado**

**Dr. Dionicio Galarza Delgado
Subdirector de Estudios de Posgrado**

**EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN Y DETECCIÓN DE TIPOS
ONCOGÉNICOS DEL VPH POR TECNOLOGÍA DE CAPTURA DE
HÍBRIDOS EN MUJERES SIN APARENTES FACTORES DE RIESGO.**

Presentado por

Dr. David de la Fuente Villarreal

Este trabajo se realizó en el Departamento de Anatomía Patológica, el Departamento de Anatomía Humana y el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario “Dr. José E. González”, bajo la asesoría del Dr. med. Oscar de la Garza Castro y la co-asesoría de la Dra. Oralia Barboza Quintana, de la Dra. Irma M. Rivera Morales y el Dr. med. Eloy Cárdenas Estrada.

Dr. med. Oscar de la Garza Castro

Director de la Tesis

Dra. Oralia Barboza Quintana

Co-asesor de la Tesis

Dra. Irma M. Rivera Morales.
Co-asesor de la tesis.

Dr. med. Eloy Cárdenas Estrada.
Co-asesor de la tesis

A PATTY:

Mi mejor amiga, mi mayor apoyo y mi esposa desde hace 25 años.

Con todo mi amor.

A PAPÁ Y MAMÁ:

Cuyo amor y especialísima amistad me han ayudado a conducir mi vida.

A MIS HIJOS:

Frutos de mi ser y mi razón de ser.

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. med. Santos Guzmán López, por su desinteresado apoyo y su amistad incondicional. Sin su ayuda este proyecto no hubiera llegado a su fin.

A mi director de tesis, el Dr. med. Oscar de la Garza Castro, por su paciencia, empeño y dedicación en la culminación de este proyecto.

A la Dra. Oralia Barboza Quintana y la Dra. Raquel Garza Guajardo, quienes revisaron todo el material de citologías y capturas, parte fundamental en la que se basan los hallazgos y resultados de esta tesis.

A la Dra. Irma M. Rivera Morales, por tanto tiempo dedicado a todo este proceso.

Al Dr. Roger A. González Ramírez, por su ayuda incondicional para poder llevar a cabo esta tesis.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I	Página
1. RESUMEN	1
Capítulo II	
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Generalidades	3
2.2 Clasificación	7
2.3 Planteamiento del problema	10
2.4 Justificación	20
Capítulo III	
3. HIPÓTESIS	21
Capítulo IV	
4. OBJETIVOS	22
4.1 Objetivo General	22
4.2 Objetivo Específico	22
Capítulo V	
5. PACIENTES Y MÉTODOS	23
5.1 Diseño	23
5.2 Población de Estudio	23
5.2.1 Universo	23
5.2.2. Tamaño de la muestra	24

5.2.3	Características de la población de estudio.	24
5.3	Métodos.	
5.3.1	Toma de la muestra.	25
5.3.2	Métodos de laboratorio.	26
5.4	Análisis estadístico.	27
Capítulo VI		
6.	RESULTADOS.	28
Capítulo VII		
7.	DISCUSIÓN.	32
Capítulo VIII		
8.	CONCLUSIONES.	34
Capítulo IX		
9.	BIBLIOGRAFÍA.	35
Anexo A		
	Cuestionario.	44
Anexo B		
	Carta de consentimiento.	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Zonas abiertas de lectura del VPH	6
2. Enfermedades causadas por VPH	9
3. Cálculo de tamaño de muestra.	24
4. Características de las pacientes	29
5. Alteraciones macroscópicas en la exploración ginecológica	30
6. Hallazgos citológicos en pacientes infectadas	30
7. Prevalencia de infección por VPH	32

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica	Página
1. Pacientes estudiados	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Obtención y conservación de la muestra	25
2. Tecnología de captura de híbridos	26

Abreviaturas.

ADN: Acido desoxirribonucleico.

ARN: Acido ribonucleico.

ASC-US: Células escamosas atípicas de significado incierto.

CACU: Cáncer cérvicouterino.

COLS: Colaboradores.

DOC: Diagnóstico oportuno de cáncer.

E: Genes de expresión temprana.

EUA: Estados Unidos de América.

FDA: Food and Drug Administration

G1: (del ingles growth) Primera fase del ciclo de la división celular en la que ocurre crecimiento y síntesis de proteínas y arn

HC1: Captura de híbridos primera generación.

HC2: Captura de híbridos segunda generación.

L: Genes de expresión tardía.

LIEAG: Lesión intraepitelial escamosa de alto grado.

LIEBG: Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado.

ORF'S: Zonas abiertas de lectura.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

Rb: Retinoblastoma.

RLUs: Unidades relativas de luz.

S: (del inglés synthex) Segunda fase del ciclo de la división celular en la que ocurre la replicación del ADN.

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

SV40: Virus simiano 40.

UANL: Universidad Autónoma de Nuevo León.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VPH: Virus del papiloma humano.

CAPÍTULO I

RESUMEN.

El virus del papiloma humano (VPH) pertenece al grupo de virus con tropismo por los epitelios, infecta predominantemente la piel y las membranas mucosas produciendo proliferaciones epiteliales benignas o papilomas, que bajo ciertas circunstancias pueden experimentar transformación maligna.

El virus del papiloma humano (VPH) es considerado el agente causal más importante del carcinoma del cérvix uterino y el conocimiento de su biología es fundamental para el entendimiento de la carcinogénesis cervical.

Existen evidencias epidemiológicas y moleculares de la estrecha relación del VPH en el desarrollo del carcinoma cervical y sus precursores.

La infección por el virus del papiloma humano, es un importante problema de salud pública en nuestro país, para el cual se ha identificado a la población con claros factores de riesgo hacia quienes se dirigen todos los esfuerzos de prevención y diagnóstico temprano. Sin embargo, existe una gran cantidad de mujeres, la mayoría de ellas amas de casa, que al no reconocerse en riesgo se desconoce su vulnerabilidad a la infección y quedan desprotegidas de los programas preventivos.

Se investigaron la frecuencia de esta infección así como los tipos oncogénicos en esta población de pacientes la cual por su condición de riesgo no aparente no son foco de atención de programas de salud pública.

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN.

2.1 GENERALIDADES.-

El cáncer cérvico-uterino (CACU) es una de las principales neoplasias malignas que afecta a las mujeres en el mundo y en nuestro país es la causa mas frecuente de mortalidad por cáncer en la mujer.¹ Desde hace varias décadas se ha reconocido su asociación epidemiológica con el inicio temprano de la actividad sexual y especialmente con múltiples parejas sexuales, lo que ya sugería una etiología transmisible, hasta que más recientemente se ha demostrado su relación con la presencia del virus del papiloma humano (VPH) en el tejido neoplásico.

Desde 1977, zur Hausen sugirió que podía existir asociación entre VPH y cáncer cervical.² En la misma década de los 70's se describieron los modelos de carcinogénesis inducida por virus en humanos, en pacientes con carcinomas escamosos cutáneos originados en epidermodisplasia verruciforme, enfermedad causada por un tipo de VPH.^{3,4}

Las verrugas o papilomas cutáneos han sido reconocidos desde la antigüedad y se presentan en prácticamente todas las especies de vertebrados; ya desde la primera década de 1900 Cliuffo estableció la etiología viral de las verrugas humanas inoculando extractos libres de células de condiloma, demostrando en forma experimental la transmisión de hombre a hombre.⁵

En 1933, Shope aisló el primer papilomavirus en los conejos cola de algodón⁶ y posteriormente en estos mismos animales se provocaron carcinomas escamosos aplicando alquitrán de hulla como promotor tumoral de los papilomas^{7, 8, 9}

En 1956, Koss y Durfee acuñaron el término *atipia coilocítica* para describir los cambios de las células escamosas anormales caracterizadas por grandes vacuolas perinucleares (coilocitos) que se encontraban en extendidos de pacientes con displasia y carcinoma invasor.¹⁰ En 1976 Meisels y Fortín¹¹ y en 1977 Puroola y Savia¹² propusieron que las células del condiloma acuminado que por ultraestructura contenían partículas virales compatibles con VPH eran idénticas a los coilocitos descritos por Koss y Durfee. Finalmente, con el advenimiento de la biología molecular fue posible la caracterización molecular de este virus.^{13,14,15}

El virus del papiloma humano es miembro de la familia *Papilomaviridae*, a la que también pertenecen el poliomavirus y el virus simiano 40 (SV40).

Los papilomavirus se caracterizan por ser pequeños virus no envueltos que miden 45–55 nm de diámetro, con una cápside protéica icosaédrica.

Su genoma de ácido desoxirribonucleico (ADN) circular de doble cadena de aproximadamente 8,000 pares de bases de longitud, contiene 9–10 regiones codificantes, denominadas zonas abiertas de lectura (ORF's por sus siglas en inglés). Dichos ORF's son secuencias de nucleótidos que codifican proteínas no estructurales (enzimas) involucradas en la regulación de las funciones virales, así como proteínas

estructurales involucradas en la producción de las diferentes partículas del virus. Aquellas que codifican proteínas no estructurales son conocidas como genes de expresión temprana o E (*“early”*) y las que codifican proteínas estructurales se denominan genes de expresión tardía o L (*“late”*) de acuerdo con el momento en que son expresados dentro del ciclo de replicación viral. En el VPH, siete u ocho de las regiones ORF's codifican para genes tempranos y únicamente dos para genes tardíos; contiene además una región no codificante, conocida como región larga de control o región reguladora principal, cuyas secuencias se encargan de la regulación de la expresión de todos sus genes, tanto de las regiones temprana como tardía¹⁶.

Se ha identificado la expresión de más de 20 secuencias de ARN mensajero, la mayoría en una forma específica a tipo celular y diferenciación. Los productos de los genes E6 y E7 han sido los más estudiados y a causa de su interacción con los genes supresores p53 y Rb y su papel en la transformación celular, se denominan oncogenes o genes transformantes, mientras que los genes denominados L1 y L2 codifican para diferentes proteínas de la cápside.¹⁷⁻¹⁸

Tabla 1. ZONAS ABIERTAS DE LECTURA DEL VPH

Funciones principales de cada uno de los genes.

E1	Modulador de la replicación de ADN
E2	Regulación de la transcripción viral
E3	Desconocida
E4	Disrupción de la citoqueratina en células escamosas
E5	Ligada a transformación celular y receptores de factores de crecimiento
E6	Proliferación y transformación celular, ligada a p53
E7	Proliferación y transformación celular, activación de la transcripción, ligada a gen Rb
L1	Mantenimiento de la proteína mayor de la cápside
L2	Mantenimiento de la proteína menor de la cápside

Infecciones por VPH.

El primer paso en una infección con el VPH es la adhesión de viriones intactos a células basales de un epitelio escamoso a partir de lo cual pueden ocurrir dos tipos de infecciones: productivas o latentes.

En las infecciones *activas* o productivas, la replicación viral se lleva a cabo principalmente en células escamosas ya diferenciadas, esto es, en las capas intermedia y superficial del epitelio escamoso, en donde ocurre una intensa actividad de replicación del ADN viral, con producción de proteínas de la cápside y ensamblaje de nuevos viriones, los cuales producen cambios celulares característicos sobre las células

infectadas que, en un estudio citológico, los efectos citopáticos incluyen acantosis, vacuolización citoplásmica prominente, atipia nuclear y binucleación.

En la infección de tipo *latente*, el ADN viral infecta predominantemente las células inmaduras (células basales o células metaplásicas) del epitelio escamoso, permaneciendo en la superficie sin replicarse, con el genoma en su forma circular libre (forma episomal) y no hay cambios morfológicos identificables en la citología, por lo que la detección viral en este tipo de infecciones solo puede hacerse por métodos moleculares.

2.2 Clasificación clinicopatológica del VPH.

En la actualidad, han sido descritos más de 100 tipos de VPH cuyas manifestaciones clínicas incluyen un amplio espectro de lesiones proliferativas en la piel y las mucosas oral, laríngea y de la región anogenital. Al menos 20 de los anteriores muestran tropismo por el tracto anogenital.¹⁸

De acuerdo al tropismo tisular y las diferentes manifestaciones clínicas del VPH, se han constituido tres grupos clínico-patológicos: cutáneo, mucoso y el grupo de la epidermodisplasia verruciforme, como se describen en la Tabla 2.^{15, 18,20}

De gran interés es el grupo con afinidad hacia las mucosas, cuyo riesgo de progresión a cáncer constituye dos grupos: un grupo de riesgo bajo o no oncogénico que incluye los tipos virales 6, 11, 42, 43 y 44 cuyas principales manifestaciones clínicas son los condilomas acuminados cutáneos y lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIEBG).²¹ En contraste, los virus de riesgo alto u oncogénicos, que incluyen los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67 y 68, se asocian a todo el espectro de lesiones intraepiteliales e invasoras, de origen escamoso, glandular y neuroendócrino.²² Los tipos 6 y 11, del grupo de bajo riesgo y los tipos oncogénicos 16 y 18, representan

dos terceras partes de todos los tipos de VPH asociados a neoplasias anogenitales. De hecho, se han reaislado, secuenciado y comparado genomas de diferentes papilomavirus; es de gran importancia mencionar que en base a estudios epidemiológicos se ha demostrado la presencia de una variante asiáticoamericana de VPH16, que es de peor pronóstico y agresividad, mientras que la variante europea se halla más frecuentemente en lesiones malignas de cabeza y cuello. El estudio de Ortiz López y cols. se basa en la anterior premisa, por lo que se realizará disección molecular de VPHs de alto riesgo, además de una caracterización de la especificidad y potencia de sus variantes (datos no publicados PROTOCOLO). El tipo 16 y el resto de los tipos relacionados están más bien asociados a lesiones del epitelio escamoso, mientras que el tipo 18 y el resto de su grupo de alto riesgo son más frecuentemente relacionados a las neoplasias glandulares.^{18, 23}

Tabla 2. ENFERMEDADES CAUSADAS POR VPH.

Grupo	Tipos virales	Lesión producida
clínico-patológico		
Grupo cutáneo	1, 4	Verrugas plantares
	2, 26, 28, 29, 38, 49, 57, 60,	Verrugas vulgares
	63, 65	
	3, 10, 27	Verruga plana
	7	Condiloma de Butcher
Grupo de la	5 y 8*	
epidermodisplasia	9, 12, 14, 15, 17, 19-25, 36,	Lesiones maculares
verruciforme	37, 46-50	
Grupo mucosotrópico	13, 32	Hiperplasia epitelial focal
	6, 11,	LIEBG, Condiloma acuminado,
		Papilomas laríngeo y conjuntival
	42-44, 53-55, 62, 66	Principalmente LIEBG
	16, 31, 33, 35, 52, 58, 67	LIEBG, LIEAG, carcinoma
		escamoso invasor
	18, 39, 45, 59, 68	LIEBG, LIEAG, carcinomas
	Escamoso, glandular y neuroendócrino	

* Tipos virales asociados a epidermodisplasia verruciforme con progresión a carcinoma.

LIEBG – Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado.

LIEAG – Lesión intraepitelial escamosa de alto grado.

2.3 Planteamiento del problema.

La prevalencia de la infección por VPH es muy variable en diferentes poblaciones, pues el resultado depende de muchas variables que incluyen la sensibilidad de la prueba utilizada, estilo de vida (factores de riesgo) del grupo estudiado, la presencia o ausencia de manifestaciones clínicas y otros cofactores.

Existen evidencias epidemiológicas y moleculares de la estrecha relación del VPH en el desarrollo del carcinoma cervical y sus precursores. Más del 90% de los carcinomas cervicouterinos contienen ADN de algún tipo de VPH, siendo el tipo 16 el de mayor prevalencia en estas lesiones, encontrándose en aproximadamente la mitad de los casos, seguido por el tipo 18 con un 12%.²⁴⁻²⁹

Se estima que aproximadamente el 1% de la población padece de verrugas genitales y que el 4% de todas las mujeres tienen lesiones intraepiteliales en el cérvix, en mujeres jóvenes esta cifra es aún mayor.²⁵⁻²⁸ Se ha calculado en forma conservadora la prevalencia del VPH en la población general de los EUA en 15 a 20%,^{18,31} esta cifra aumenta sorprendentemente en cohortes de mujeres jóvenes estudiadas con reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con valores que alcanzan hasta el 46%.^{32, 33} En un estudio realizado en jóvenes mexicanos con dos o más parejas sexuales, Sánchez-Alemán y colaboradores reportaron una prevalencia de VPH del 14.4%.³⁴ El curso de la infección depende principalmente del tipo de VPH, así como de la edad de adquisición y del estado inmune de la paciente. Las mujeres menores de 35 años son más susceptibles de adquirir infecciones genitales con virus no oncogénicos que en la mayoría de los casos desaparecen; en cambio, en las mujeres mayores de 35 años es más común la persistencia de la lesión con cambios clínicos y morfológicos y con mayor riesgo de progresión neoplásica.^{23, 28-30,35}

Ortiz López y cols. realizaron un estudio en Monterrey, Nuevo León, México en el cual se encontró que de un total de 3,419 muestras de frotis cervicales, 3,082 (90 %) eran positivos para cadenas de β -globina, de éstos, se detectó genoma de VPH por PCR en 599 muestras (19 %). (Datos no publicados)

El modelo de carcinogénesis inducida por el virus del papiloma humano, se ha podido establecer con base en evidencias epidemiológicas y moleculares.

Los productos génicos del VPH controlan estrechamente la red de oncogenes y antioncogenes celulares que regulan la proliferación celular y la síntesis de ADN.¹⁸

El virus infecta tanto las células basales como las parabasales o las células de reserva, las cuales tienen la capacidad de dividirse y diferenciarse a epitelio escamoso, glandular o neuroendócrino; en el caso de las células con diferenciación escamosa la maduración ocurre a través del engrosamiento del epitelio, con cambios moleculares previos a las alteraciones morfológicas. Si estas células son infectadas por el VPH pueden ocurrir diferentes secuencias de eventos.

El evento más común cuando las células basales morfológicamente normales son infectadas por el VPH, es que inhiban la expresión de los genes virales permitiendo la diferenciación celular a expensas de la pérdida de su capacidad de dividirse. Ésta expresión se le denomina “productiva” y afecta las células que inician su diferenciación escamosa, en quienes las regiones tempranas del virus permiten la expresión de todos los genes virales con producción de viriones completos (episomal) justo debajo de la superficie. Morfológicamente esta lesión puede ser identificada como una lesión de bajo grado con células que muestran atipia coilocítica, las cuales usualmente regresan o se mantienen igual por largo tiempo. En las lesiones de bajo grado y en la mayoría de las de alto grado el VPH es episomal y el gen E2 se encuentra intacto³⁴⁻⁴⁰. Por otra

parte, lesiones de alto grado se encuentran asociadas a la infección por tipos de VPH de riesgo alto, aunque no exclusivamente.

Por otro lado, los responsables de la pérdida del control de la proliferación celular son los genes virales transformantes E6/E7. En estudios realizados *in vitro* sobre cultivo de tejidos se ha demostrado que los genes transformantes E6/E7 son complementarios y cuando sólo uno se expresa, su poder transformante es muy débil, estos genes se expresan con mayor frecuencia en los tipos virales de riesgo alto como 16 y 18 y su expresión no se observa en los de riesgo bajo como 6 y 11.⁴¹⁻⁴⁶

Si se toma en cuenta la baja frecuencia de las lesiones de alto grado en comparación con las de bajo grado, se podría concluir que sólo en la minoría de los casos el efecto que producen los genes E6/E7 es eficiente para producir un fenotipo permanente o transformado.⁴⁷

La sobreexpresión de los genes transformantes puede ser consecuencia de la pérdida del gen viral E2, cuya función es la producción de proteínas reguladoras de la transcripción de las regiones tempranas del virus, que a su vez reprimen la transcripción de E6/E7; en las lesiones de bajo grado y en la mayor parte de las de alto grado el VPH se encuentra en su forma episomal y el E2 está intacto. Sin embargo, en más del 90% de los carcinomas el VPH está integrado en el ADN de la célula huésped, la integración interrumpe los sitios de lectura de E2/E1 pero deja intactos a E6/E7, liberándolos de la regulación y permitiendo su expresión. Cuando la expresión de estos genes ocurre en la población de células que aún pueden dividirse, da como consecuencia el inicio de la proliferación celular a través del epitelio, que se traduce en una maduración escamosa desorganizada, con sobrecrecimiento de células basales. Estos cambios son interpretados morfológicamente como una lesión epitelial de alto grado.

Couturier y colaboradores han encontrado secuencias integradas de VPH cerca de los oncogenes c-myc, n-myc y c-Ha-ras del genoma humano,⁴⁸ la interrupción de la secuencia reguladora de estos oncogenes podría liberar la expresión de las proteínas E6/E7.

Por otra parte, la oncoproteína E6 del VPH 16 se une a la p53 y esta unión produce la degradación de la p53, proteína que es un importante represor o controlador del crecimiento y diferenciación celular en parte por estimulación de p21 y p16,⁴⁹⁻⁵¹ y la proteína E7 parece impedir la regulación del crecimiento celular mediante una unión competitiva con la ciclina A1, la p107 y al gen del retinoblastoma, quienes regulan la progresión de las células desde la fase G₁ a la fase S,⁴⁹ esto causa una importante pérdida del control de la proliferación celular dando como resultado una proliferación no controlada. En carcinomas que no contienen VPH se han encontrado mutaciones de punto en la p53 y en el gen del retinoblastoma.⁵⁰

Cofactores:

La secuencia de eventos anteriormente descritos son insuficientes para explicar los pocos casos en los que no se encuentra integrado el virus VPH, es probable que se encuentran interactuando con una serie de cofactores o promotores tumorales como el tabaquismo, otros virus, mutaciones genéticas al azar, etc., estos cofactores actúan como inductores de inestabilidad cromosómica con desarrollo de aneuploidia en el sitio específico en el que el VPH se integra al genoma, con pérdida de los signos que regulan la expresión de E6/E7. Por otra parte las células basales derivadas de la sobre expresión de E6/E7 tienen mayor predisposición a la adquisición de errores genéticos adicionales como mutaciones de punto, selección clonal, entre otros. Es posible que los mutágenos

externos y/o la predisposición genética del huésped promueven el desarrollo de un fenotipo completamente maligno.¹⁸

El modelo de carcinogénesis que explica el carcinoma de cérvix es un proceso multifactorial, donde otro importante factor es el sistema inmune del huésped, de tal manera que una supresión inmunológica provee el campo propicio para el desarrollo de neoplasias, lo cual es debido a que predispone a la infección con virus oncogénicos y permite que la proliferación neoplásica escape a los mecanismos reguladores del huésped. Esto queda demostrado por la evidencia epidemiológica de que la infección por VPH es más frecuente en individuos inmunosuprimidos y que los condilomas que desarrollan tienden a ser más grandes, multicéntricos y refractarios a tratamiento;⁵² por otra parte, ciertos agentes terapéuticos como la aziatropina, los corticoesteroides y los agentes alquilantes potencian aún más el compromiso del sistema inmune. Al respecto se ha visto que las pacientes con trasplante renal tienen un incremento en el riesgo relativo para desarrollar cáncer de cérvix (5.4 veces más que la población general). Estudios publicados en pacientes con SIDA han demostrado un aumento en la frecuencia de lesiones intraepiteliales. Sun y colaboradores, en un estudio realizado en Nueva York, encontraron que el 56% de las pacientes seropositivas para VIH tenían infección por VPH, contra el 31% de las seronegativas, con una prevalencia acumulada del 83% y 62% respectivamente, por otra parte la persistencia de las lesiones intraepiteliales fue de 24% en el primer grupo y del 4% en el segundo. El tipo de VPH asociado con mayor frecuencia fue el 16. Se puede concluir por lo tanto que, en las mujeres positivas para VIH la prevalencia de infección por VPH de alto riesgo, así como la persistencia de la lesión, es mayor que en la población general.⁵³

Por otra parte, Delmas y colaboradores demostraron que la prevalencia y la incidencia de lesiones intraepiteliales en las pacientes con VIH es dos veces mayor en las pacientes que tenían cuentas de linfocitos CD4+ menores a 200×10^6 y que además no respondían al tratamiento cuando no habían sido tratadas previamente con antiretrovirales.⁵⁴⁻⁵⁶

Uno de los mayores impactos de las evidencias antes mencionadas sobre el comportamiento biológico de las lesiones intraepiteliales, fue la terminología implementada desde 1988 por el Sistema Bethesda, separando en dos grandes grupos a las lesiones intraepiteliales del cérvix uterino: lesiones de bajo grado y de alto grado, según su riesgo para el desarrollo de carcinoma invasor del cérvix; de esto se deduce que desde el punto de vista morfológico sólo tiene importancia identificar las lesiones mediante los criterios establecidos, como bajo grado (displasia leve y condiloma), y alto grado (displasia moderada, severa y carcinoma *in situ*) y que no existe evidencia justificada para intentar clasificar las lesiones en todo el espectro de las displasias.⁵⁷

Por otra parte es importante interrelacionar cambios morfológicos que ocurren en el epitelio y que observamos con microscopía convencional, con los cambios moleculares que han sufrido las células infectadas, ejemplo de esto son:

- Crecimiento nuclear e hiper cromasia como resultado directo de la síntesis del ADN del huésped, mediada por la activación de los genes virales E6/E7.
- Aumento en la relación núcleo-citoplasma a causa de una síntesis anormal del ADN del huésped mediada por E6/E7.
- Halos perinucleares producidos por una forma anormal de citoqueratina regulada por la expresión del gen E4 del VPH.

El proceso de la integración y expresión de los oncogenes virales puede darse también en forma incompleta, entonces las células provenientes de la superficie tendrían un

crecimiento nuclear menos importante (¿ASC-US?), por el contrario, si el proceso se desarrolla en forma completa las células del epitelio escamoso son identificadas morfológicamente como lesión de bajo grado.¹⁸ A pesar de que los citopatólogos diferencian morfológicamente la lesión por VPH de la displasia leve, esta diferencia sólo representa una variación temporal dentro del ciclo de vida de las lesiones de bajo grado.

El modelo de neoplasia cervical escamosa no explica del todo la secuencia de eventos de las neoplasias glandulares y neuroendocrinas, ya que las células de reserva destinadas a una diferenciación glandular pierden el ambiente apropiado para la diferenciación escamosa y no pueden producir viriones y el ciclo de vida del virus requiere de dicha diferenciación; la infección viral en células destinadas a la diferenciación glandular debe sufrir un proceso abortivo o ser latente en células endocervicales morfológicamente normales, ya que estas células no son permisivas, esto podría explicar en parte que las lesiones glandulares sean menos frecuentes que las escamosas. El VPH 18 parece tener más éxito en inducir cambios glandulares que otros tipos, probablemente porque el VPH 18 tiene mayor facilidad para integrarse en el genoma humano y también porque parece tener mayor predisposición a integrarse a células que van a diferenciarse hacia otro tipo de epitelio.⁵⁶⁻⁵⁹

Lutz y colaboradores reportaron que p16, que normalmente es un supresor tumoral asociado a la quinasa dependiente de ciclina (CDK por sus siglas en inglés), se encuentra aumentada en las lesiones glandulares y escamosas malignas o premalignas y no en las lesiones glandulares benignas, por una relación con la producción de las oncoproteínas virales E6/E7 del VPH 16, de tal manera que la p16 pudiera ser utilizada como un marcador con inmunohistoquímica, para diferenciar lesiones glandulares

malignas de lesiones glandulares que semejan esta lesión como la metaplasia tubárica, la hiperplasia microglandular y la endometriosis.⁶⁰

Diagnóstico de la infección por VPH por medio de la tecnología del ADN.

Las características histológicas sugestivas de infección por VPH son un predictor extremadamente pobre de la detección de la enfermedad.

La prueba para el diagnóstico de VPH de alto riesgo se ha propuesto como un método de estratificación de mujeres con anormalidades leves a limítrofes hallados en los frotis de Papanicolaou en programas de tamizaje convencionales^{61,62} y como suplemento o posible reemplazo de la citología como prueba primaria de tamizaje.^{63,64}

Los miembros de la familia VPH no se pueden cultivar *in vitro*; por lo tanto la detección de VPH depende estrictamente de análisis moleculares de la secuencia de ADN del virus.⁶⁵

Existen varias técnicas moleculares suficientemente sensibles y confiables para la detección del VPH: la hibridación *in situ*, implica el empleo de sondas para detectar secuencias específicas de ADN.⁶⁶ Las muestras histológicas y la visualización de los núcleos teñidos que contienen VPH, bajo visión microscópica son desafortunadamente inexactos y han sido superados por métodos biológicos moleculares.⁶⁷

Metodología de las pruebas de detección de VPH

Hay esencialmente 3 tipos de métodos de hibridación de ácidos nucleicos usados para detectar el VPH, siendo estos la sonda de ácidos nucleicos directa, métodos de amplificación blanco y la amplificación de la hibridación de la señal.

Métodos de sonda directa. La técnica estándar es la “*Southern Blot*”, usada en los primeros estudios del VPH, detecta hasta 5,000 copias por muestra y fue considerado como método estándar de referencia.⁶⁸ Sin embargo, su aplicación de manera extensa es limitada debido a que es un método que consume tiempo, puede ser técnicamente difícil y frecuentemente dependiente del uso de sondas radiomarcadas con ³²P, además de la subjetividad de la interpretación autoradiográfica.⁶⁷

Amplificación blanco. El método más comúnmente utilizado es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), creado en 1985 por Cetus Corporation®⁶⁹ basado en una técnica de amplificación de regiones específicas de ADN *in vitro*, lo cual incrementa su sensibilidad. La PCR puede teóricamente producir un millón de copias a partir de una molécula de ADN de doble cadena después de 30 ciclos de amplificación.⁷⁰ Los inconvenientes de este tipo de métodos son: el uso de secuencias de VPH patentadas, lo que limita su empleo debido a restricciones legales del propietario de la marca; también el PCR está sujeto a contaminación ambiental debido a que material previamente amplificado puede potencialmente contaminar especímenes negativos y causar la obtención de resultados falsos positivos.⁶⁵

Amplificación de señal. Alrededor de 1990, Digene Corporation desarrolló una patente para la detección de ácidos nucleicos por la tecnología de la Captura de Híbridos®⁷⁰ para diferentes agentes entre los que se incluye el VPH.

Tecnología de la captura de híbridos®.

El primer *estuche* para detectar VPH por medio de amplificación de señal, basado en la captura de híbridos salió al mercado en 1995.⁷² La técnica de la captura de híbridos

(HC1® por sus siglas en inglés) era una técnica relativamente rápida, un procedimiento de tipo inmunoensayo, diseñada para detectar al menos 16 tipos de VPH⁷³, divididos en tipos de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, y 56) y de bajo riesgo (6, 11, 42, 43, 44 y 53). Inicialmente se empleó para aumentar la sensibilidad de las pruebas basadas en el frotis convencional de Papanicolaou y para proveer un valor predictivo negativo significativo para evaluar la displasia cervical.⁷⁴ En marzo de 2000, la FDA (*Food and Drug Administration*)⁷² aprobó la segunda generación de este método. La captura de híbridos de segunda generación (HC2®) es una prueba estandarizada que se emplea de manera muy extensa en estudios de investigación y ha sido de uso clínico de rutina por cerca de 3 años. La Captura de Híbridos® es una técnica no radiactiva, quimioluminiscente que se puede realizar en la mayoría de los laboratorios clínicos con experiencia en pruebas de alta complejidad.⁶⁵ La HC2® puede diferenciar entre los dos grupos de ADN del VPH: VPH de bajo riesgo carcinogénico (6,11, 42, 43 y 44) y el grupo de subtipos de VPH de alto riesgo carcinogénicos (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68)^{65, 75} a un nivel de 1 pg/ml cada uno, que corresponde a 5,900 genomas de VPH cada prueba.⁷⁶ La prueba del VPH por HC2® en mujeres con diagnóstico citológico de ASC-US VPH han tenido en promedio una sensibilidad de 90% y una especificidad de 70%.

2.4 Justificación.

La infección por el virus del papiloma humano, causa del carcinoma cérvicouterino, es un importante problema de salud pública en nuestro país, para el cual se ha identificado a la población con claros factores de riesgo hacia quienes se dirigen todos los esfuerzos de prevención y diagnóstico temprano del sector salud. Sin embargo, existe una gran cantidad de mujeres, la mayoría de ellas amas de casa, que al no reconocerse en riesgo se desconocía su vulnerabilidad a la infección y quedan desprotegidos de los programas preventivos.

A partir de esta premisa, es de interés estudiar un grupo de población en el que aparentemente no existe riesgo de contraer la infección pero que en realidad se desconocía la verdadera prevalencia de la infección y por ende la magnitud del problema.

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis de investigación

La prevalencia de infección por VPH en población femenina sin aparentes factores de riesgo se encuentra por debajo de 15 %.

(Esto en base a los estudios epidemiológicos realizados por Sánchez Alemán y cols, y Ortiz López y cols.)

CAPÍTULO IV

OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la frecuencia de infección por VPH en población femenina sin aparentes factores de riesgo que espontáneamente acude a realizarse la prueba de Papanicolau en el Hospital Universitario “Dr. José E. González”.

4.2 Objetivos específicos

Determinar la distribución de los diferentes tipos oncogénicos de VPH (alto y bajo riesgo) en un grupo de mujeres sin aparentes factores de riesgo del Hospital Universitario “Dr. José E. González”.

Describir la presencia de los tipos considerados de alto y bajo riesgo.

Correlacionar uno y otro grupo de tipos de VPH con su resultado de la prueba de Papanicolau.

Identificar conductas o características que previamente no hayan sido consideradas como factores de riesgo y que si lo sean.

CAPÍTULO V

PACIENTES Y MÉTODOS

5.1 Diseño

El presente estudio de investigación corresponde a un escrutinio; es decir, es transversal, descriptivo y observacional.

Además se compararon algunas variables demográficas entre las mujeres infectadas y no infectadas.

5.2 Población de estudio

5.2.1 Universo

El universo de estudio fueron pacientes que espontáneamente solicitaron una prueba de citología vaginal en el módulo de detección oportuna de cáncer (D.O.C.), del servicio de Ginecología, en el Hospital Universitario “Dr. José E. González” de la U.A.N.L.

Las pacientes fueron captadas en forma prolectiva en el lapso de un año, a partir de enero de 2006.

5.2.2 Tamaño de la muestra calculado:

En el estudio fueron 282 pacientes (con un error alfa de 5% y una diferencia delta del 3.5%).

Tabla 3. Calculo de tamaño de muestra

Estudios de Prevalencia $z_{\alpha,2}^2 * p * (1-p) / (\delta^2)$	
alfa p%	5
Prevalencia conocida %	15
Diferencia Delta %	3.5
p 1 cola	0.050
z	1.645
n	282

Número de mujeres incluidas: 343.

El tamaño de muestra se calculó a partir de la prevalencia de infección por VPH de 14.4%, reportada en un grupo de mujeres jóvenes mexicanas.

5.2.3 Características de la población del estudio

A) Criterios de inclusión:

Fueron incluidas en el estudio pacientes femeninas mayores de 13 años.

Que hayan iniciado su vida sexual.

B) Criterios de exclusión:

Pacientes con antecedentes de infección por virus del papiloma humano.

Paciente que se reconozca en riesgo para contraer infección por VPH: más de dos parejas sexuales, antecedentes de infecciones de transmisión sexual, sexoservidoras.

Que no firme la carta de consentimiento

C) Criterios de eliminación:

Muestra insuficiente.

Que no se cuente con la información del cuestionario

5.3 Métodos

5.3.1 Toma de la muestra

El personal de salud adscrito al módulo de D.O.C., del Hospital Universitario “Dr. José E. González” de la U.A.N.L. previamente capacitado, obtuvo las muestras de la zona de transición del cérvix uterino con un pequeño cepillo cónico y rotándolo tres veces, después de lo cual se colocó en un tubo de 5 ml con el medio de transporte de citología de base líquida. (Fig. 1).

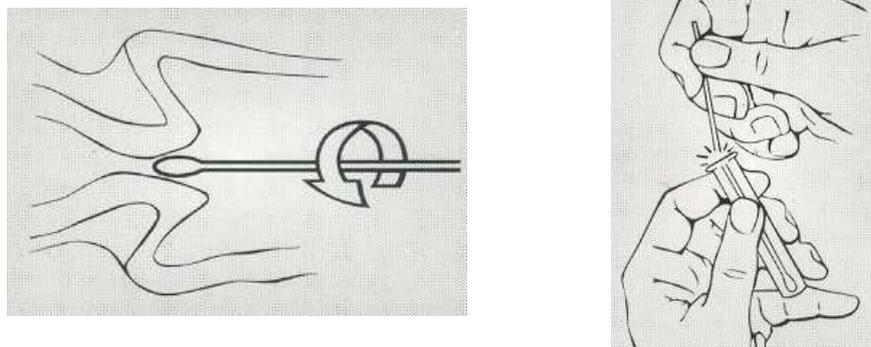


Fig. 1.- Obtención y conservación de la muestra

5.3.2 Métodos de laboratorio:

Se desarrollaron los siguientes procedimientos (Fig. 2):

1. Extracción de ácidos nucleicos: Los especímenes clínicos se combinan con una solución alcalina, que rompe la célula epitelial para liberar el ADN blanco.
2. Hibridación de sondas de ARN con el ADN blanco: El ADN blanco se combina con sondas de ARN específicas, creándose híbridos ARN:ADN.
3. Captura de híbridos: Los múltiples híbridos ARN:ADN son capturados en una fase sólida recubierta con anticuerpos específicos para los híbridos ARN:ADN Comercial.
4. Marcaje para su detección: Los híbridos ARN:ADN capturados son detectados con múltiples anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina. La señal resultante puede ser amplificada por lo menos 3,000 veces.
5. Detección, lectura e interpretación de resultados: La fosfatasa alcalina fijada es detectada con un substrato dioxetano quimioluminiscente. Al momento de tal unión el substrato produce luz, la cual es medida en un luminómetro en Unidades Relativas de Luz (RLUs por sus siglas en inglés).^{71, 73}

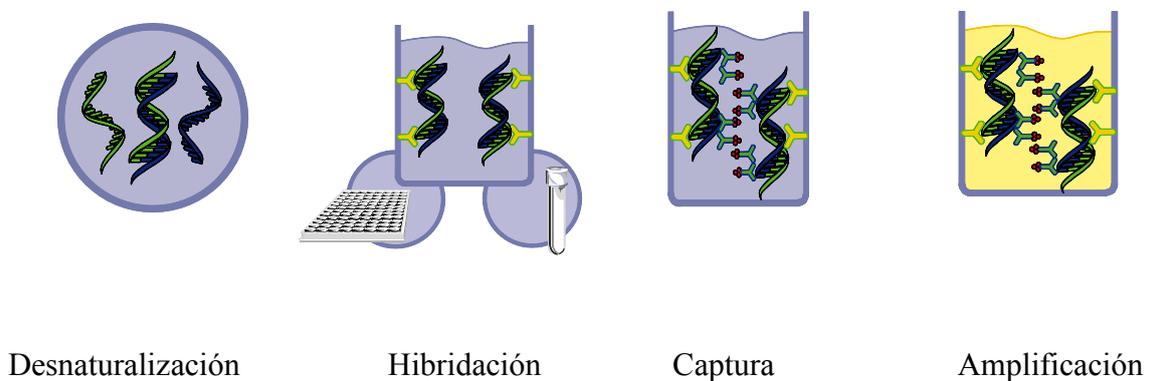


Fig. 2.- Tecnología de captura de híbridos 2.

5.4 Análisis estadístico:

Se utilizó estadística descriptiva, frecuencias y porcentajes para describir la prevalencia de infección por VPH y se expresaron los porcentajes de cada uno de los tipos identificados.

Se correlacionó la presencia de infección por tipos oncogénicos con los diferentes factores de riesgo que pudieron identificarse por medio del cuestionario, utilizando la prueba de chi cuadrada, con un nivel de significancia estadística de 0.05

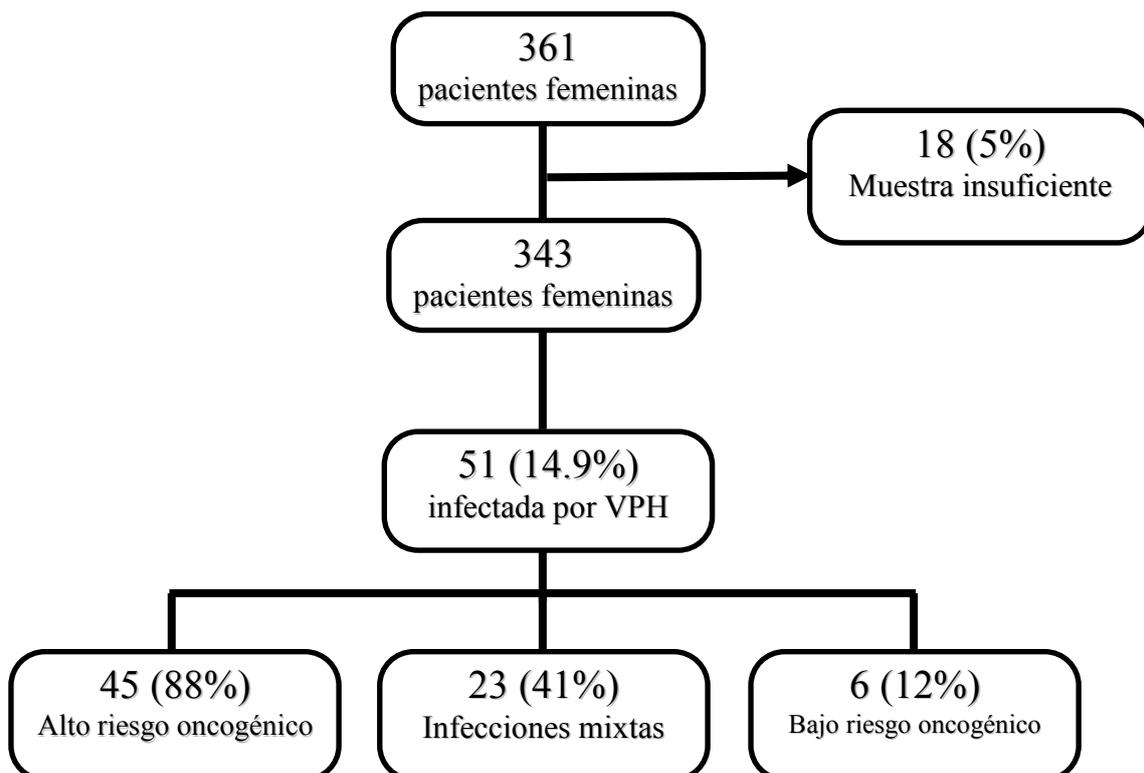
CAPÍTULO VI

RESULTADOS

Se estudiaron 361 mujeres, de las cuales se eliminaron 18 (5%) por no haberse obtenido muestra suficiente. Para el análisis participaron 343 pacientes con una edad mediana de 41 años y un intervalo de 15 a 97 años. Refirieron haber iniciado su actividad sexual a los 19.8 años (mediana), con un intervalo de 13 hasta 35 años (Gráfica 1).

En 51 de 343 pacientes, (14.9%) se demostró infección por VPH, de cualquier tipo. De alto riesgo oncogénico fueron 45 pacientes (88%). De bajo riesgo oncogénico se identificaron 29 casos (57%). Con infecciones mixtas fueron 23 casos (41%). Seis casos (12%) lo fueron únicamente de virus de bajo riesgo.

Gráfica 1.- Pacientes estudiados



El 53% de las pacientes infectadas declararon una sola pareja sexual y el 47%, dos compañeros sexuales. En este grupo el inicio de la actividad sexual fue a los 19.7 años, en promedio.

En cuanto al estado civil de las pacientes infectadas el 65% (33) eran casadas y un 6%(3) en unión libre (grupo en el que se asume una pareja estable). Mientras que 9 (17%) eran solteras y 6 (12%) divorciadas (Tabla 3).

Tabla 4.- Características de las pacientes.

Característica	Pacientes infectadas (51)
Estado Civil	33 (65%) Casadas
	9 (17%) Solteras
	3 (6%) Unión libre
	6 (12%) Divorciadas
Inicio de vida sexual	19.7 años
Número de parejas sexuales	53% una sola pareja
	47% Dos parejas sexuales

En el 82% (42/51) de las pacientes infectadas su exploración ginecológica no mostró alteraciones. En 4 mujeres sólo se describió leucorrea y en una, cervicitis (10%). En 4 pacientes se observaron erosiones (8%) (Tabla 4).

En el 4% de las pacientes infectadas, la citología se reportó negativa y en el 66% sólo cambios inflamatorios inespecíficos.

Tabla 5.- Alteraciones macroscópicas en la exploración ginecológica.

	Alteraciones Macroscópicas
51 pacientes infectadas	42 (82.35%) No mostró alteraciones
	4 (7.84%) Leucorrea
	1 (1.96%) Cervicitis
	4 (7.84%) Erosiones

En 18% el reporte fue células escamosas atípicas de significado incierto (ASC-US). En 6% con lesión intraepitelial de bajo grado (LIEBG). En 6% con lesión intraepitelial de alto grado (LIEAG).

Tabla 6.- Hallazgos citológicos en pacientes infectadas

Citología	Cambios inflamatorios			
	inespecíficos	ASC-US	LIEBG	LIEAG
Negativa				
4.00%	66.00%	18.00%	6.00%	6.00%

En el total de las 343 mujeres evaluadas la citología reportó cambios compatibles con VPH en 9 de ellas (2.6%). Tres de esos nueve casos con citología compatible con VPH, se observaron entre las 292 mujeres con prueba de hibridación negativa (1%). De 51 mujeres infectadas la citología no observó anomalías y en solo 6 citologías se visualizaron lesiones atribuibles al VPH, lo que equivale a una sensibilidad del 66.7%. Por el contrario, 45 citologías de pacientes infectadas se reportaron negativas

(especificidad 86.5%). De 292 mujeres no infectadas la citología reportó ASC-US en 27 pacientes (9%).

CAPÍTULO VII

DISCUSION

En 14.9 de cada 100 mujeres sin aparentes factores de riesgo se demostró infección por VPH, prevalencia que es equiparable a la publicada en una población de jóvenes universitarios mexicanas⁷⁴.

El 15% de prevalencia de la infección por VPH en nuestra población fue muy inferior a la publicada por las series americanas, que va de 26.8% en población general de 14 a 59 años, hasta 44.8% en el grupo de 20 a 24 años de edad; lo cual se puede explicar por la diferente cultura al respecto de la sexualidad, entre ambas poblaciones⁷⁵.

Tabla 7.- Prevalencia de infección por VPH.

Prevalencia		
Americana 14-59 años	Americana 20-24 años	Estudio
26.80%	44.80%	15.00%

La mayoría de los casos de infección por VPH detectadas por captura de híbridos HC2[®] no mostraron alteraciones a la exploración ginecológica. Sólo se reportaron cambios inflamatorios inespecíficos en la citología. Lo cual se explica porque los cambios moleculares preceden a los cambios macro y microscópicos.

Los hallazgos citológicos de LIEBG ó LIEAG se observaron con mayor frecuencia en el grupo de solteras o divorciadas (se podría asumir una mayor frecuencia de contactos ocasionales o menor probabilidad de una pareja fija, en ellas y en sus compañeros).

La mayoría de las pacientes con ASC-US en la citología, iniciaron vida sexual entre 17 y 18 años de edad promedio y se encontraban casadas al momento del estudio.

La presencia de tipos de VPH de bajo riesgo oncogénico se detectó en mujeres con inicios más tempranos de la actividad sexual, con una edad mediana de 17 años y un intervalo de 13 a 21, mientras que en las pacientes infectadas con virus altamente oncogénicos la edad mediana de inicio de su actividad sexual fue de 19.5 años y un intervalo de 14 a 34, de acuerdo con lo publicado en la literatura³².

En el total de las 343 mujeres evaluadas la citología reportó cambios compatibles con VPH en 9 de ellas (2.6%). Tres de esos nueve casos con citología compatible con VPH, se observaron entre las 292 mujeres con prueba de hibridación negativa (1%). De 51 mujeres infectadas la citología no observó anomalías y en solo 6 citologías se visualizaron lesiones atribuibles al VPH, lo que equivale a una sensibilidad del 66.7%. Por el contrario, 45 citologías de pacientes infectadas se reportaron negativas (especificidad 86.5%). De 292 mujeres no infectadas la citología reportó ASC-US en 27 pacientes (9%).

De tal manera se concluye que con los métodos tradicionales de diagnóstico, no es posible detectar todas las pacientes infectadas con VPH por lo cual sería deseable practicar pruebas moleculares para diagnóstico de la infección.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES

Como se pudo demostrar en este estudio la exploración ginecológica normal no descarta la presencia de VPH. Igualmente, una citología normal o con cambios inflamatorios inespecíficos, tampoco permite concluir la ausencia de VPH. De tal manera que la detección temprana de infección por VPH requiere métodos moleculares de diagnóstico. Aquellas mujeres que no se reconocen con factores de alto riesgo para infección por VPH, no están excluidas de la posibilidad de contraer el virus de papiloma, por lo que aún en ellas deberá realizarse pruebas de escrutinio, preferentemente moleculares.

Estas mujeres por no pertenecer a los grupos de alto riesgo, los sistemas de salud no enfocan sus esfuerzos de prevención y diagnóstico hacia ellas y sin embargo la prevalencia de esta enfermedad según quedó demostrado en esta investigación es tan alta como la de la población general.

CAPÍTULO IX

BIBLIOGRAFÍA.

1. Estadísticas de mortalidad en México: Muerte Registrada en año 2000. Salud Pública de México. 2002 4(3): 266-288.
2. Zur Hausen H. Human papilomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 1977; 78:1-30.
3. Jablonska S, Dabrowski J, Jakubowicz K. Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses in oncogenesis. *Cancer Res* 1972; 32:583-589.
4. Lutzner MA. Epidermodysplasia verruciformis: An autosomal recessive disease characterized by viral warts and skin cancer; a model for viral oncogenesis. *Bull Cancer* 1978; 65:169-182.
5. Zur Hausen H. Papilomaviruses in human cancer. *Cancer* 1987, 59:1692-1696.
6. Shope RE, Hurst EW. Infectious papillomatosis of rabbits. With a note on the histopathology. *J Exp Med* 1933; 58:607-624.
7. Rous P, Kidd JG. The carcinogenic effect of a virus on tarred skin. *Science* 1936; 83:468-469.
8. Kidd JG, Rous P. A transplantable rabbit carcinoma originating in a virue induced papilloma and containing the virus in masked or altered form. *J Exp Med* 1940; 71:813-837.
9. Syverton JT. The pathogenesis of the rabbit papillomato-carcinoma sequence. *Ann NY Acad Sci* 1952; 54:1126-1140.

10. Koss LG, Durfee GR. Unusual patterns of squamous epithelium of uterine cervix: Citologic and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann NY Acad Sci* 1956; 63:1245-1261.
11. Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol* 1976; 20:505-509.
12. Purola E, Savia E. Cytology of gynecologic condiloma acuminatum. *Acta Cytol* 1977; 21:26-31.
13. Gissmann L, Pfister H, zur Hausen H. Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology* 1977; 76:569-580.
14. Gissmann L, deVilliers EM, zur Hausen H. Analysis of human genital warts (condylomata acuminata) and other genital tumors for human papillomavirus type 6 DNA. *Int J Cancer* 1982; 29:143-146.
15. DeVilliers EM. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* 1989; 63:4898-4903.
16. Howley PM. Papillomaviruses and their replication. Field BN, Knipe DM. Field's virology, 3^o edición, New York: Raven Press; 1995:947-979.
17. Broker TR. Structure and genetic expression of papillomaviruses. *Obstet Gynecol North Am* 1987; 14:329-348.
18. Stoler MH. Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis. *Int J Gynecol Pathol* 2000;19:16-28
19. Yee c, Krishnan-Hewlett I, Baker CC, Schlegel R, Howley PM. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 1985;119:361-366

20. De Villiers EM. Hybridization methods other than PCR: an update. En Muñoz N, Bosch FX, Shah KV, et al, eds. Epidemiology of cervical cancer and human papillomaviruses. Oxford, UK: Oxford University Press; 1992; 1:112-134.
21. Calleja-Macias IE, Kalantari M, Allan B, et al. Papillomavirus subtypes are natural and old taxa: Phylogeny of human papillomavirus types 44 and 55 and 68^a and -b. *J Virol* 2005. 79 (10): 6565-6569.
22. Calleja-Macias IE, Villa LL, Prado JC, et al. Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, and 58, and closerelatives of human papillomavirus type 16. *J Virol* 79: 13630-13640.
23. Feichter G, Meisels A. Task force report on HPV-related changes of the lower female genital tract. *Acta Cytol* 2002; 46:630-632.
24. Muñoz N, Bosch FX, de SanJosé S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M, Navarro P, Martos C, Ascunce N, González LC, Kaldor JM, Guerrero E, Lorincz A, Santamaría M, Alonso de Ruiz P, Aristizabal N, Shan K. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: A population based Case-Control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 1992; 52:743-749.
25. Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992; 327:1272-1278.
26. Arends MJ, Wyllie AH, Bird CC. Papillomaviruses and human cancer. *Human Pathol* 1990; 21:686-698.
27. Muñoz N, Bosch FX. Cáncer del cérvix y virus del papiloma humano: evidencia epidemiológica y perspectivas para su prevención. *Sal Púb Méx* 1997; 39:388-396.

28. Mougín C, Dalstein V, Pretet JL, et al. Epidemiology of cervical papillomavirus infections. Recent knowledge. *Presse Med* 2001; 30:1017-1023.
29. Riethmüller D, Schaal JP, Mougín C. Epidemiology and natural history of genital infection by human papillomavirus. *Gynecol Obstet Fertil* 2002; 30; 139-146.
30. Kurman RJ, Jenson AB, Lancaster WD. Papillomavirus infection of the cervix. II. *Am J Surg Pathol* 1983; 7:39-52.
31. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Is J Med* 1997; 102:3-8.
32. Bauer HM, Ting Y, Greer CE, et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 1991; 265:472-477.
33. Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, et al. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis* 1993; 20:274-278.
34. Sánchez-Alemán MA, Uribe-Salas F, Conde-González CJ. Human papillomavirus infection, a possible biological marker of sexual behavior among university students. *Salud Pública Mex* 2002; 44:442-447.
35. Kjaer SK, van den Brule AJ, Paull G, et al. Type specific persistence of high human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *BMJ* 2002; 325:572-578.
36. Stoler MH, Broker TR. In situ hybridization detection of human papillomavirus DNAs and messenger RNAs in genital condylomas and cervical carcinoma. *Human Pathol* 1986; 17:1250-1258.

37. Stoler MH, Wolinsky SM. Differentiation-linked human papillomavirus types 6 and 11 transcription in genital condyloma revealed by in situ hybridization with message-specific RNA probes. *Virology* 1989; 172:331-340.
38. Stoler MH, Whitbeck A, Wolinsky SM. Infection cycle of human papillomavirus type 11 in human foreskin xenografts in nude mice. *J Virol* 1990;64:3310-3318
39. Cullen AP, Reid R, Campion M. A Analysis the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasia. *J virol* 1991; 65:606-612.
40. Matsukura T, Koi S, Sugase M. Both episomal and integrated forms of human papillomavirus type 16 are involved in invasive cervical cancer. *Virology* 1989;172:63-72
41. Bedell MA, Jones KH. Identification of human Papillomaviruses type 18 transforming genes in immortalized and primary cell. *J virol* 1989; 63:1247-1255.
42. Bedell MA, Jones KH. The E6/E7 region of human papillomavirus type 18 is sufficient for transformation of NIH3T3 and rat-1 cell. *J Virol* 1987; 61:3635-3640.
43. Bergeron C, Barrasso R. Human papillomavirus associated with cervical intraepithelial neoplasia. Great diversity and distinct distribution in lower and high-grade lesions. *Am J Surg Pathol* 1992; 16:641-649.
44. Kanda T, Furuno A. Human papillomavirus type 16 open reading frame E7 encodes a transforming gene for rat 3Y1 cell. *J Virol* 1988;62:610-613.

45. Phelps WC, Yee CL. The human papillomavirus type 16 E7 gene encode transcription and transforming functions similar to those of adenovirus E1AQ. *Cell* 1988;58:539-547.
46. Pirisi L, Ysumoto S. Transformation of human fibroblast and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol* 1987; 61:1061-1066.
47. Crook T, Morgenstern JP. Continued expression of HPV 16 E7 protein required for maintenance of transformed phenotype of cell co-transformed by HPV 16 plus E_j-ras. *EMBO J* 1989;8:513-519.
48. Couturier J, Sastre-Garau X. Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas an its consequences for proto-oncogene expression. *J Virol* 1991;65:4534-4538.
49. Eliyahu D, Michalovitz D. Wild type p 53 can inhibit oncogene mediated focus formation . *Proc Natl Acad Sci* 1989;86:8763-8767.
50. Fujita M, Inoue M. Alteration of teration of the p53 gene in human primary cervical carcinoma with and without human papillomavirus infection. *Cancer Res* 1992;52:5323-5328.
51. Finlay CA, Hinds PW. The p53 protoncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989;57:1083-1093.
52. Scheffner M, Werness BA. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990;63:1129-1136.
53. Dyson N, Howley PM. The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Sciencie* 1989;243:934:937.

54. Sillman F, Staneck A. The relationship between human papillomavirus and lower genital intraepithelial neoplasia in immunosuppressed women. *Am J Obstet Gynecol* 1984;150:300-308.
55. Sun XW, Ellerbrock TV. Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 1997 6; 337(19):1343-1349.
56. Delmas MC, Larsen C. Cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women: prevalence incidence and regression. European Study Group on Natural History of HIV infection in women. *AIDS* 2000 ;14(12):1775-84.
57. Solomon D, Darvey D. The 2001 Bethesda System: Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287:2114-2119.
58. Duggan MA, Benoit JL. The human papillomavirus status of 114 endocervical adenocarcinomas cases by dot blot hybridization. *Human Pathol* 1993;24:121-125.
59. Stoler MH, Millis SE. Small-cell neuroendocrine carcinomas of the cervix. A human papillomavirus type 18-associated cancer. *Am J Surg Pathol* 1991;15:28-32.
60. Riethdorf MD, Riethdorf S. Human papillomavirus, Expression of p16, and Early Endocervical glandular Neoplasia. *Human Pathol* 2002; 33:899-904.
61. Cox JT, Lorincz AT, Schiffman MH, et al. Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 946-954.

62. Hatch KD, Schneider A, Abdel-Nour MW. An evaluation of human papillomavirus testing for intermediate and high-risk types as triage before colposcopy. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 1150-1157
63. Meijer CJLM, van der Brule AJC, Snijders PJF, et al. Detection of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction in relation to cytology: possible implications for cervical cancer screening. En: Muñoz N, Bosch FX, Shah KV, Meheus A (editores). *The epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1992. pp. 271-281.
64. Cuzick J, Szarewski A, Terry G, et al. Human papillomavirus testing in primary cervical screening. *Lancet* 1995; 345: 1533-1536.
65. Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 940-945.
66. Granner DK. Tecnología del DNA recombinante. En: Granner DK, Murray RK, Mayes PA, Rodwell VW (editores). *Bioquímica de Harper*. Ed. Manual Moderno; 1997. pp. 541-559.
67. Farthing A, Masterson P, Mason WP, Vousden KH. Human papillomavirus detection by hybrid capture and its possible clinical use. *J Clin Pathol* 1994; 47: 649-652.
68. Schneider A, Grubert T. Diagnóstico de infección por papilomavirus con tecnología de DNA recombinante. *Clin Obstet Ginecol* 1989; 1: 125-136.
69. Leffel MS, Donnemberg AD, Rose NR. Molecular techniques applied to infectious diseases. En: Leffel MS, Donnemberg AD, Rose NR (editores). *Handbook of Human Immunology*. CRC Press 1997: 160-165. ****

70. Iftner T, Villa LL. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31: 80-88.
71. Obiso R, Lorincz AT. Digene Corporation. *Pharmacogenomics* 2004; 5(1): 129-132.
72. Vince A, Kutela N, Iscic-Bes J, et al. Clinical utility of molecular detection of human papillomavirus in cervical samples by hybrid capture technology. *J Clin Virol* 2002; 25: S109-S112.
73. Lörincz AT. Hybrid Capture™ method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: A tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening. *J Obstet Gynecol Res* 1996; 22 (6): 629-636.
74. Vernick JP, Steigman CK. The HPV DNA hybrid capture assay: what it is-and where do we go from here?. *MLO* 2003 March: 8-10, 13-15.
75. Crabtree D, Unkraut A, Cozens D, et al. Role for HPV in ASCUS: A cytologic-Histologic correlation. *Diagn Cytopathol.* 2002; 27: 382-386.
76. Lörincz AT. Screening for cervical cancer: new alternatives and research. *Salud Pública Mex.* 2003; Suppl 3: S376-S387.

ANEXO A.

CUESTIONARIO:

FOLIO.....

Edad: _____

Estado civil: Soltera Casada Divorciada Viuda Unión
libre

A qué edad inició a tener relaciones sexuales: _____

A la fecha ¿ cuántos compañeros sexuales ha tenido? _____

¿ Alguna vez le han diagnosticado alguna infección sexual? Sí No

Cuál: _____

Si recuerda el diagnóstico señale:

Sífilis Gonorrea Herpes Verrugas

Sabe si su pareja ha tenido alguna infección sexual? Sí No

Cuál: _____

Si recuerda el diagnóstico señale:

Sífilis Gonorrea Herpes Verrugas

¿ Cuánto tiempo hace que se hizo su último Papanicolau ?

¿Cuál fue el resultado de su último Papanicolau ?

Normal o negativo Inflamación o infección Cáncer No
recuerdo

ANEXO B

CARTA DE CONSENTIMIENTO

Se me ha informado que el cáncer del cuello de la matriz es causado muy frecuentemente por la presencia de un virus llamado VPH.

Se me ha invitado a participar en un estudio de investigación en el que pretenden identificar la infección por este virus en mujeres sin manifestaciones de enfermedad,

Para dicho estudio se requiere únicamente la toma de una muestra del cuello de mi matriz obtenida al mismo tiempo que la prueba de Papanicolau.

Además se me solicita la contestación verídica de un pequeño cuestionario sobre mis hábitos a partir de que inicié mi actividad sexual, información que me garantizan se manejará en forma anónima y absolutamente confidencial.

Se me ha asegurado que dicha prueba no implicará ningún riesgo y ningún costo económico para mí.

También me han explicado que si me arrepintiera a colaborar con dicho estudio, no influirá en el resultado de la prueba de Papanicolau, así como de cualquier otro estudio o tratamiento que requiera en el futuro en este Hospital Universitario “Dr. José E. González”.

Yo, _____ expreso mi libre consentimiento para colaborar en este estudio:

Firma: _____

Testigo: _____

Testigo: _____

Fecha:

Nombre y firma del investigador: _____

