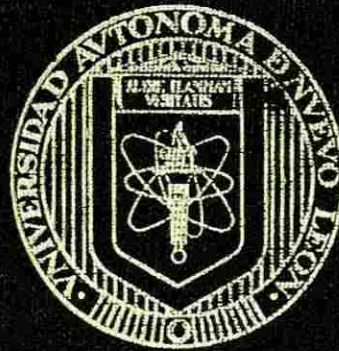


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



**SEGUIMIENTO A TRES AÑOS DE MUJERES
ASINTOMATICAS PORTADORAS DEL VIRUS
DEL PAPILOMA HUMANO**

Por

QFB Oscar Raúl Fajardo Ramírez

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias con Especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética**

MARZO, 2006

TM

RC280

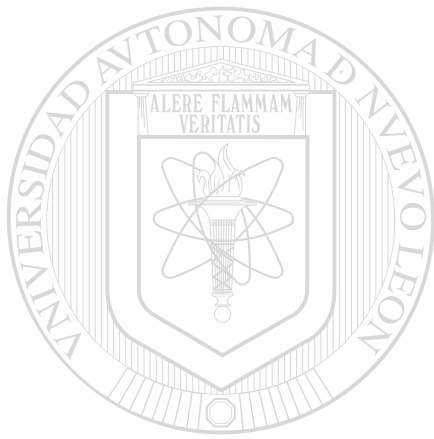
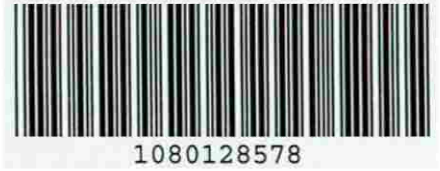
.U8

F3

2006

e.1

QFB Oscar Raúl Fajardo Ramírez



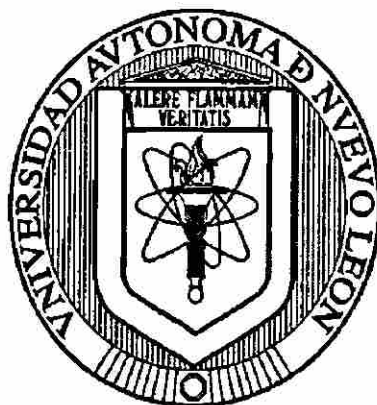
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**SEGUIMIENTO A TRES AÑOS DE MUJERES
ASINTOMÁTICAS PORTADORAS DEL VIRUS
DEL PAPILOMA HUMANO**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

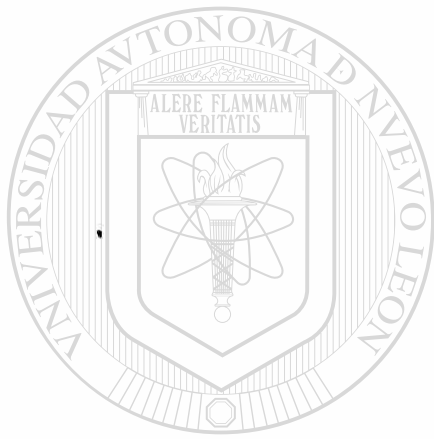
Por

QFB Oscar Raúl Fajardo Ramírez

Como requisito para obtener el grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Marzo 2006

TM
RC 280
.U8
F3
2006



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

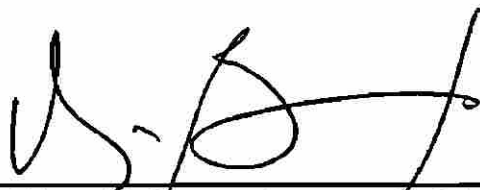
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS




SEGUIMIENTO A TRES AÑOS DE MUJERES ASINTOMÁTICAS PORTADORAS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

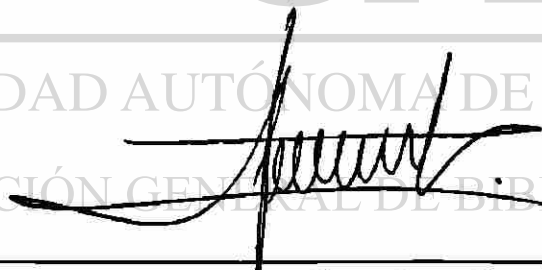
Aprobación de la tesis:



Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña
Director de Tesis



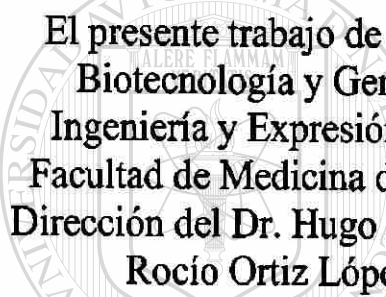
Dra. Rocío Ortiz López
Co-Director de Tesis



Dr. Juan Francisco González Guerrero
Co-Director de Tesis



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



El presente trabajo de investigación se llevo a cabo en los laboratorios de Biotecnología y Genética Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Dirección del Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña y la Co-Dirección de la Dra. Rocío Ortiz López y el Dr. Juan Francisco González Guerrero.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Agradecimientos

***Al Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña
Por todo las enseñanzas que me dejo tanto académicas como personales***

***Al Dr. Juan Francisco González Guerrero
Por cada uno de los consejos que me brindo, mi mas sincera admiración y respeto***

***A la Dra. Roció Ortiz López y al Dr. Augusto Rojas Martínez
por haberme invitado y apoyado durante la realización de esta meta personal***

***A mis amigos de la ULIEG por sus platicas y hacer muy agradable esta estancia;
Ivan, Miguel, Juan Manuel, Bere, Sofi, Michelle, Ceci, Jorge, Víctor, Carmen Garza,
Rafa, Yazmine, los chavos de colima***

***Al equipo del VPH y el CaCU, Dra. Geraldina Guerrero, Dr Lezmez Valdez, Dra. Sofia,
Dra Iliana Hernández, Dr. Juan Pablo Alarcón***

***A todos los futuros investigadores de la ULIEG que con sus tips y sugerencias ayudaron a
resolver problemas de laboratorio y de la vida;
Carmen Barboza, Luis Miguel, Ángel, Dra. Olivia, Edith, Mary, Maggie, Chiu,
Victor (UDM), Iram, Ali, Andrés***

***A mis amigas las secres de Bioquímica por toda la ayuda que me brindaron en la
realización de esta investigación y por hacer me sentir como su amigo;
Juanny, Irazema, Denise, Claudia, Keren, Lupita***

***A los Doctores, Herminia Martínez, Francisco Velásquez, Ana Maria Rivas, Gerardo
Padilla, Agnés Revol, Abelardo Chávez, Rocío Castro, la Lic. Edith Flores y la CP Raque
Cardiel***

***A todas y cada una de las mujeres que participaron en esta investigación
así como al personal de la Secretaria de Salud***

***A mi familia y Juanny por toda su comprensión y por su apoyo en los momentos buenos y
malos de esta etapa de mi vida***

*****Dedicatoria*****

A mi mamá y a mi papá por soportar las locuras de su hijo mayor, por sus consejos y regañños pero sobre todo por todo el amor que me dieron.

A Juanny por compartir conmigo esta aventura en la investigación, echarme porras y regañarme cuando era necesario y cuando no.

A una gran familia: Los Ramírez, Los Fajardo y Los Bernabé.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



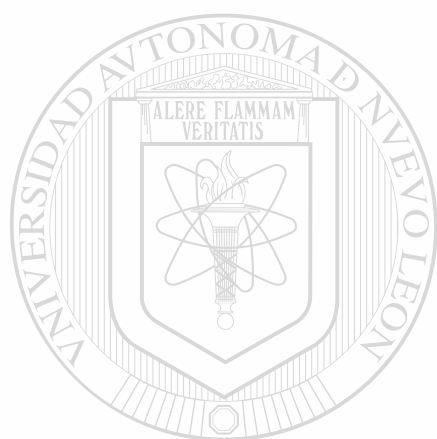
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA DE CONTENIDO

SECCIÓN	Página
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	viii
I INTRODUCCIÓN	1
1.1 El Virus del Papiloma Humano (VPH)	1
1.2 El grupo del VPH	1
1.3 Mecanismo de acción	3
1.4 Epidemiología	5
1.5 El VPH y el CaCU	6
1.6 Factores de riesgo para infección por VPH	8
1.7 Factores de susceptibilidad y persistencia de la infección por VPH	10
1.8 Desarrollo de lesiones intraepiteliales y su evolución hacia CaCU	12
1.9 Métodos de diagnóstico para la detección de lesiones intraepiteliales	14
1.9.1 Papanicolaou	14
1.9.2 Colposcopia	15
1.9.3 Detección del ADN viral	16
II JUSTIFICACIÓN	18
III OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo general.	19

3.2	Objetivos específicos.	20
IV	MATERIAL Y MÉTODOS	21
4.1	Estrategia general	21
4.2	Lugar de trabajo	22
4.3	Reactivos, materiales y equipos	23
4.3.1	Reactivos utilizados	23
4.3.2	Material utilizado	24
4.3.3	Equipo	24
4.4	Métodos	25
4.4.1	Localización de las pacientes y toma de muestra (2005)	25
4.4.2	Extracción de ADN a partir de cepillado vaginal	25
4.4.3	Análisis electroforético del ADN	26
4.4.4	Amplificación de la región L1 del VPH	26
4.4.5	Hibridación con sondas específicas para detección y tipificación de VPH	27
4.4.6	Análisis Estadístico	28
V	RESULTADOS	29
5.1	Localización de las pacientes y toma de muestra.	29
5.2	Extracción de ADN a partir de cepillado vaginal.	31
5.3	Amplificación de la región L1 del VPH.	31
5.4	Hibridación con sondas específicas para detección y tipificación de VPH.	34
5.5	Análisis de resultados.	35
5.5.1	Incidencia de infección por VPH en la población de estudio.	35
5.5.2	Tipificación y prevalencia con relación a los hallazgos del 2002.	35
5.5.3	Persistencia, reinfección y eliminación del VPH.	36
5.5.4	Factores ambientales asociados con infecciones persistentes por VPH.	38
5.5.5	Desarrollo de lesiones por infección con VPH.	41

VI DISCUSIÓN	44
VII CONCLUSIONES	49
VIII BIBLIOGRAFIA	50
ANEXOS	54



UANL

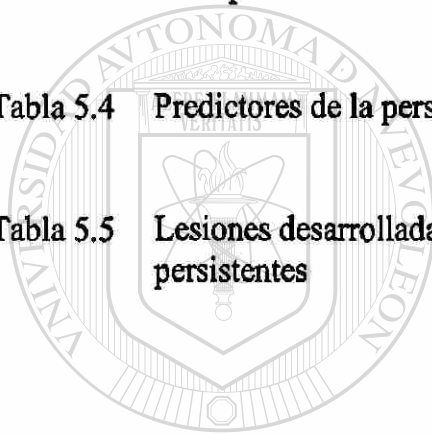
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

TABLA	TITULO	PAGINA
Tabla 1.1	Incidencia del VPH en Monterrey	8
Tabla 5.1	Concentraciones utilizadas en la PCR de la región L1 del VPH	32
Tabla 5.2	Condiciones del ciclo de la PCR para amplificar la región L1 del VPH	32
Tabla 5.3	% de persistencia de los VPHs	37
Tabla 5.4	Predictores de la persistencia de la infección con el VPH	39
Tabla 5.5	Lesiones desarrolladas en las pacientes con infecciones persistentes	43



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	TITULO	PAGINA
Figura 1.1	Genoma del VPH	2
Figura 1.2	Mecanismo de acción	4
Figura 1.3	Distribución de la incidencia de CaCU por país en el continente Americano	5
Figura 1.4	Modelo de la infección con el virus del papiloma humano y el cáncer cervical	7
Figura 1.5	Posibles consecuencias de los polimorfismos en los genes del HLA	11
Figura 1.6	Aspecto anatómico microscópico del desarrollo del cáncer cervical	12
Figura 1.7	Etapas en el desarrollo histológico microscópico del cáncer cervical	13
Figura 1.8	Papanicolau	15
Figura 1.9	Técnica de Colposcopia	16
Figura 4.1	Estrategia experimental general	22
Figura 5.1	Factores de riesgo	30
Figura 5.2	ADN extraído del cepillado vaginal utilizando la técnica de proteinasa K	31
Figura 5.3	Amplificación de la región L1 del VPH	33
Figura 5.4	Detección y tipificación del VPH	34
Figura 5.5	Comparativa de la prevalencia del VPH detectada tras las tipificaciones del 2002 y 2005	36
Figura 5.6	Grupo que eliminó la infección	41
Figura 5.7	Grupo con infección persistente	42

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por ciento
°C	Grados centígrados
ADN	Acido desoxiribonucleico
CaCU	Cancer cérvico-uterino
CUCC	Centro universitario contra el cáncer
D	Displasia
dNTP	Dinucleotidos trifosfato
EDTA	Acido etilen diamino tetraacetico (por sus siglas en ingles)
ETS	Enfermedades de transmisión sexual
g	Gramos
HLA	Antígenos leucocitarios humanos (por sus siglas en ingles)
IL	Interleucina
LCR	Región de control larga (por sus siglas en ingles)
M	Molar
Met	Método
mg	Miligramos
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (por sus siglas en ingles)
min	Minuto
ml	Mililitros
mM	Milimolar

μM	Micromolar
Mod	Modelo
n	Tamaño de muestra
Neg Proc Infl	Negativo con proceso inflamatorio
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
nm	nanometros
No	Numero
ORF	Marco abierto de lectura (por sus siglas en ingles)
p	Probabilidad
PA	Producto amplificado
Pap	Papanicolau
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en ingles)
pmoles	Picomoles
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio (por sus siglas en ingles)
SSNL	Secretaria de Salud de Nuevo León
Taq	ADN polimerasa
U	Unidades
ULIEG	Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas
V	Volumen
VPH	Virus del papiloma humano
μl	Microlitros

RESUMEN

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica
Presenta: Oscar Raúl Fajardo Ramírez

SEGUIMIENTO A TRES AÑOS DE MUJERES ASINTOMÁTICAS PORTADORAS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

Introducción: El cáncer cervical (CaCU) ocupa la primera causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel nacional. Diversos estudios han encontrado al VPH en más del 90% de los casos de CaCU¹. Se ha detectado el ADN del virus entre el 5-40% de la población femenina sin presentar algún síntoma. Aun y cuando la mayoría de las infecciones con el VPH se han reportado como infecciones transitorias, las cifras de casos de muerte por CaCU en países en vías de desarrollo son alarmantes². Al parecer, además del tipo de virus con que la mujer se infecte, factores y co-factores como el tabaquismo, la edad, el número de parejas sexuales, el alcoholismo, etc¹. participan en la progresión hacia cáncer, pero dichos factores no se han podido establecer concretamente, así como tampoco los agentes que favorecen la persistencia de la infección. Por lo que es de suma importancia establecer el rango de tiempo en que una infección asintomática pueda desarrollar lesiones, así como también los factores y cofactores que promueven la persistencia de la infección.

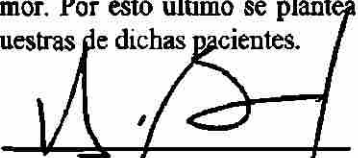
Objetivo: Busca factores y cofactores de persistencia de infecciones con el VPH.

Materiales: TE 1X, SDS 10%, Proteinasa K (20mg/ml), Fenol, Cloroformo, TE 9X, Etanol 70%, Isopropanol 100%, Acetato de Amonio 8M, Precerveyt y Estuche Amplicor HPV de Roche, Inc.

Métodos: a 129 mujeres sin lesiones cervicales diagnosticadas VPH positivas en el verano del 2002 se les tomó una muestra de cepillado cervical, que fue colectada en un a solución preservadora de células y se le extrajo el ADN usando la técnica de proteinasa K. Una vez extraído el ADN se llevó acabo la PCR para la detección del VPH usando los primers biotinilados PGMY09/11. El producto amplificado fue hibridado con las tiras de nylon del estuche Amplicor de Roche, las cuales tienen embebidas 27 sondas para 27 tipos de VPH. Por otra parte se realizó un papanicolau a cada paciente para verificar la aparición de lesiones causada por la infección con VPH de hace tres años.

Resultados: 129 Mujeres VPH positivas fueron localizadas tres años después para analizar la presencia del VPH y la aparición de lesiones epiteliales debidas al virus. La edad promedio fue de 39 ± 11 años, el estado civil en su mayoría fue casado, y la educación básica (primaria y secundaria) predominó en el grupo de estudio. En el grupo de mujeres estudiadas el 20.9% presentó un a infección con el VPH, de estas mujeres infectadas, el 51.9% presentaba una infección con el mismo tipo de VPH que tres años atrás, es decir una infección persistente. De las infecciones persistente, el 42.9% desarrollo algún tipo de lesión. Factores como la edad de la primera relación sexual, la edad durante el primer embarazo, el consumo de suplementos vitamínicos, la infecciones múltiples, infecciones con VPHs de bajo riesgo oncogénico y la referencia de un estado civil diferente al de casada resultaron de riesgo para la persistencia de la infección con el VPH.

Conclusiones: La infección con el VPH es una infección transitoria ya que la mayoría de las mujeres logran eliminar la infección sin tratamiento alguno (87.9%). Ya que no se encontró algún factor epidemiológico causante de esta eliminación se piensa que el factor principal para este suceso esta a nivel del contenido genético, es decir algún polimorfismo (HLA, p53, IL-10, etc) o la sub-expresión de algún gene supresor de tumor. Por esto último se plantea como perspectiva evaluar ciertos genes relacionados con el CaCU en las muestras de dichas pacientes.


Dr. Hugo A. Barrera S.
Director de Tesis


Dra. Rocío Ortiz L.
Co-Director de Tesis


Dr. Juan E. González G.
Co-Director de Tesis

CAPITULO I.

INTRODUCCION

1.1 El Virus del Papiloma Humano (VPH).

El virus del papiloma humano (VPH) es uno de los agentes de transmisión sexual más comunes en hombres y mujeres a nivel mundial. Su persistencia en estas últimas se considera el principal factor de riesgo para cáncer cervico-uterino (CaCU). Dado que no presenta signos ni síntomas, no existen datos precisos de la incidencia o prevalencia¹. Sin embargo, se estima que el 20% de la población en México esta infectada con este virus. Se han reconocido más de 100 tipos de VPHs en base a las diferencias en su secuencia de ADN. De acuerdo a su asociación con el cáncer cervical o lesiones precursoras, los tipos de VPH se han agrupado en virus de alto y bajo riesgo oncogénico. Los tipos de bajo riesgo incluyen al 6, 11 y 42 entre otros, mientras que los de alto riesgo al 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, y al 70.²

1.2 El grupo del VPH.

Los papilomavirus son miembros de la familia *Papovaviridae*, la cual incluye también a los poliomavirus y al virus vacuolar del simio. El VPH es un virus pequeño, sin envolturas, con un diámetro de 55 nm y tiene una cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros. Cada capsómero es un pentámero de la proteína mayor de la cápside, L1; aunque la cápside contiene también varias copias de la proteína menor, L2.

El genoma del VPH es una doble cadena circular de ADN, de aproximadamente 8000 pb, asociada a histonas³. El genoma del VPH está dividido en tres regiones, tal y como se muestra en la figura 1.1

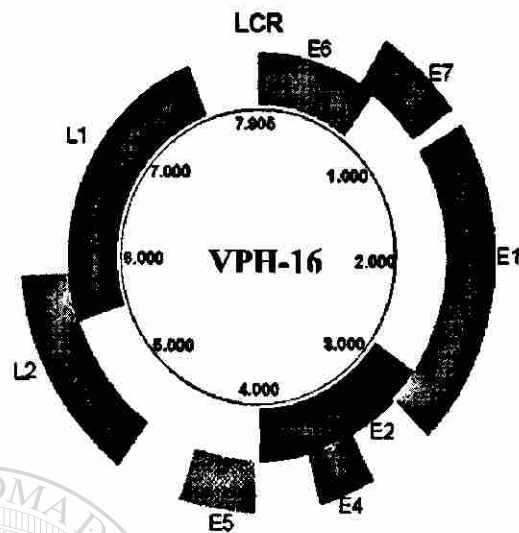


Figura 1.1. Genoma del VPH. Este está compuesto de tres regiones nucleotídicas: los genes de la región temprana (E), los de la región tardía (L) y la región reguladora ó LCR. Mientras que las primeras dos codifican para proteínas, la última controla la expresión de las anteriores. Tomado de 3

La región de control larga (LCR). Consiste de 400 a 1000 pb (dependiendo del tipo y variante de VPH) y está encargada del control de la transcripción del ADN viral mediante la transcripción de los marcos abiertos de lectura (ORFs). Esta región comprende diferentes secuencias como promotores, potenciadoras (enhancers) y silenciadores.

Región temprana (E). Esta región contiene los ORFs E1, E2, E4, E5, E6 y E7, los cuales codifican para las proteínas que se encargan de la replicación viral y la oncogénesis.

Región tardía (L). Esta región contiene los ORFs de las proteínas L1 y L2, las cuales son las proteínas que constituyen la cápside viral.

1.3 Mecanismo de acción.

El VPH tiene la característica de necesitar células de la epidermis o de mucosas que mantengan su actividad de proliferación elevada. En dichas células la maquinaria de transcripción y traducción esta trabajando constantemente, por lo que esta particularidad resulta muy conveniente para el ciclo de vida del VPH. Una vez que el virus entra a la célula, comienza la expresión de los genes E5, E6 y E7, los cuales aún cuando sus productos son escasos, tienen la capacidad de aumentar la proliferación de la célula y por ende el encendido de la maquinaria de transcripción y replicación. La proteína E5 forma complejos con moléculas como los receptores del factor de crecimiento epidermal, del factor de crecimiento derivado de plaquetas y del factor estimulador de colonias. Dichas uniones estimulan el crecimiento celular. La proteína E6 por su parte se une y degrada rápidamente a la proteína p53, la cual está encargada de iniciar el arresto celular o la apoptosis (muerte celular programada) cuando detecta alguna alteración en la secuencias del ADN celular (mutaciones), por lo que la proteína p53 no lleva a cabo su función y se produce una de las características principales de las células cancerosas: la inmortalización (Figura 1.2). Por otro lado, la proteína E7 se une al complejo formado por las proteínas Rb, DP y E2F para desplazar y dejar libre a este último, el cual una vez suelto estimula la expresión de los genes virales a través de su unión a los promotores celulares y virales; además se ha demostrado que la proteína E7 tiene efectos estimulantes sobre las ciclinas A y E, aparte de inactivar inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (WAF1 y KIP)^{1,4,5,6}(Figura 1.2).

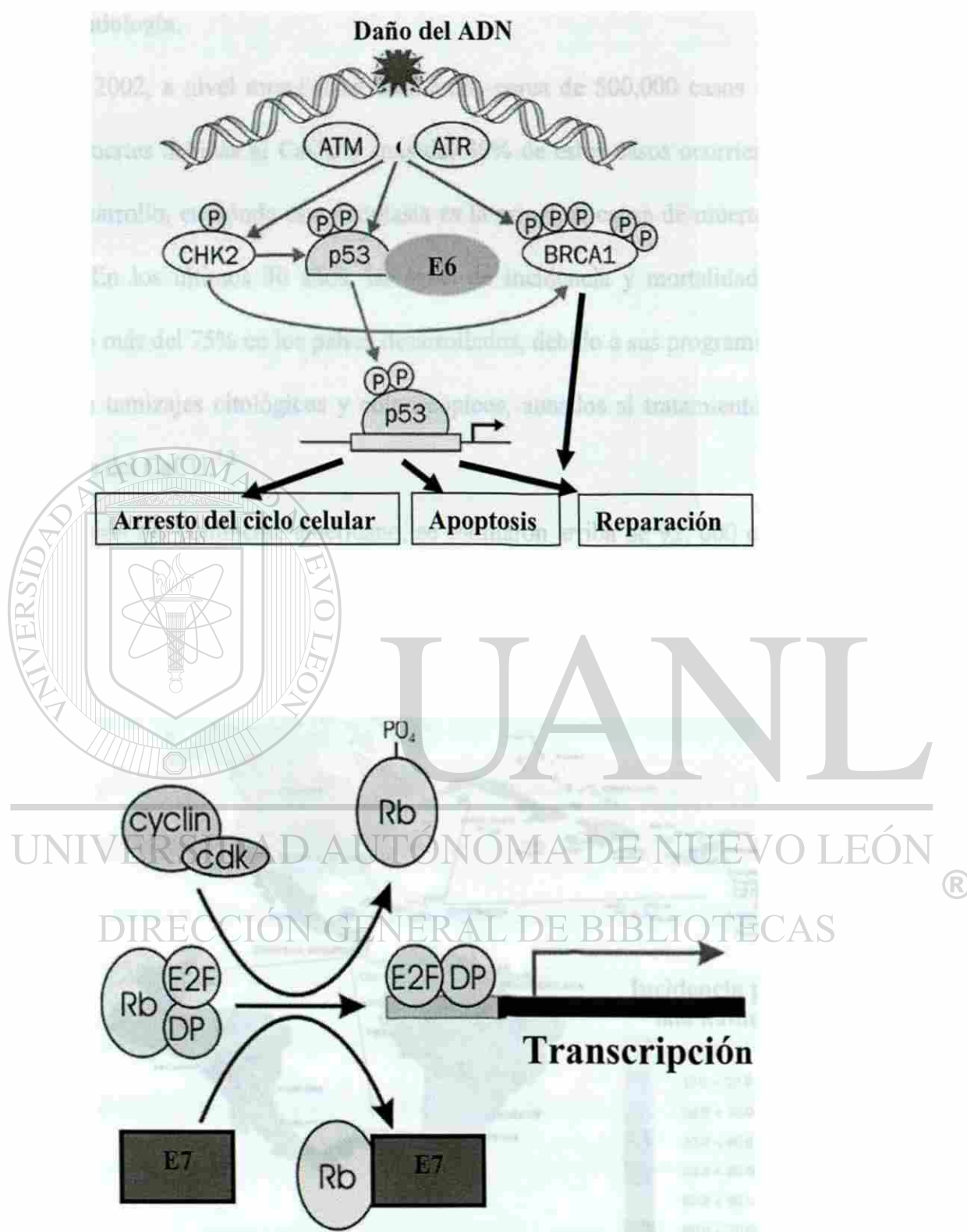


Figura 1.2 Mecanismo de acción de las oncoproteínas del VPH y sus blancos celulares. Arriba: E6 se une y degrada a la proteína supresora de tumores p53, mientras que abajo se ilustra como E7 actúa impidiendo que pRb se una al factor de transcripción E2F, por lo que este último al estar solo puede activar la transcripción de genes celulares encargados de llevar a la célula a través del ciclo celular. Tomado de 39

1.4 Epidemiología.

En el año 2002, a nivel mundial se estimaron cerca de 500,000 casos y poco más de 200,000 muertes debidas al CaCU y más del 80% de estos casos ocurrieron en países en vías de desarrollo, en dónde esta neoplasia es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres. En los últimos 30 años, las tasas de incidencia y mortalidad del CaCU han disminuido más del 75% en los países desarrollados, debido a sus programas de prevención basados en tamizajes citológicos y colposcópicos, aunados al tratamiento de las lesiones precursoras del CaCU.^{7,2}

Para la región del continente americano, se estimaron arriba de 92, 000 casos y 35, 000 muertes, con mas del 80% de los casos y muertes acontecidas en América Latina y el Caribe^{8,9} (Figura 1.3).

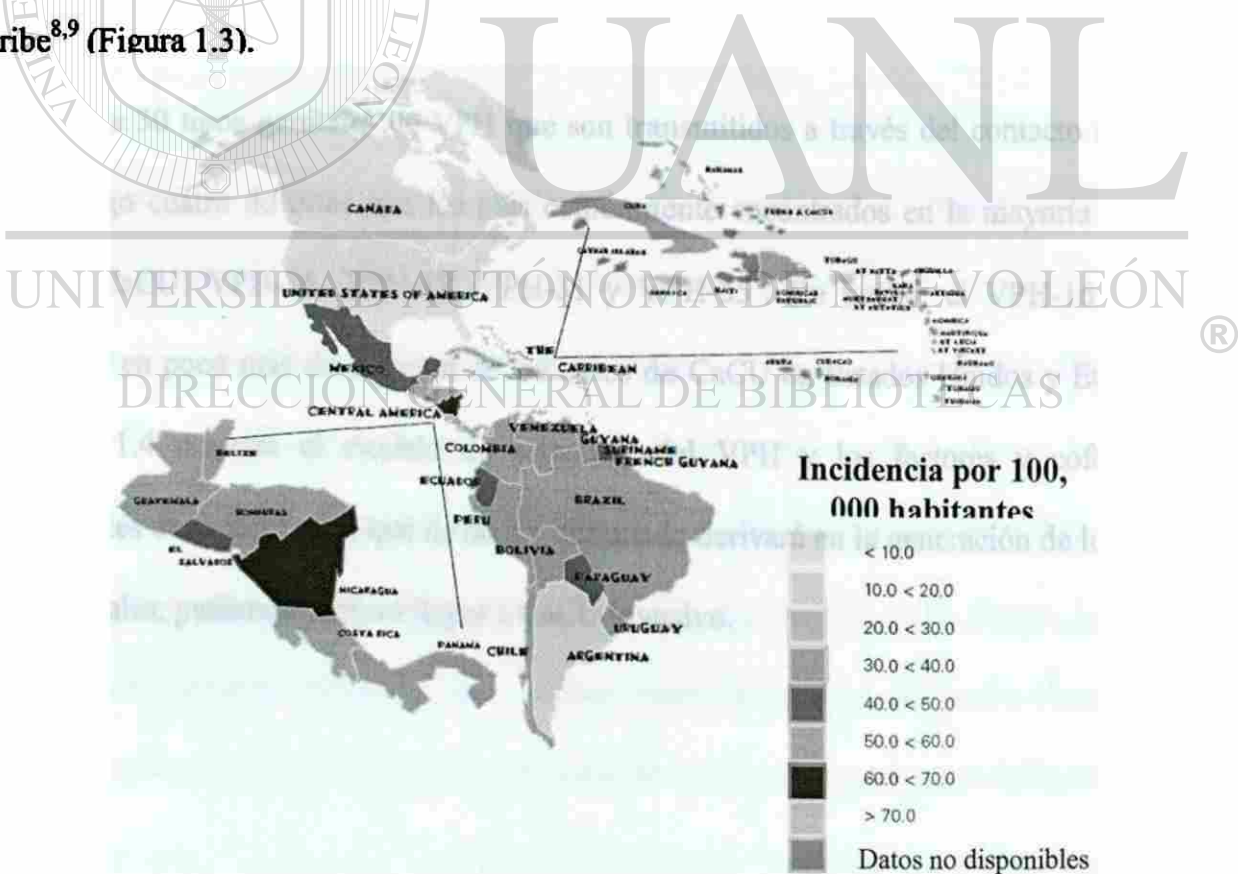


Figura 1.3 Distribución de la incidencia de CaCU por país en el continente Americano. El mapa muestra la incidencia estandarizada por edad de casos de cáncer cervical por cada 100, 000 habitantes en cada país.^{tomado de 10}

En México, para el período de 1990 a 2000 se reportaron oficialmente un total de 48, 761 defunciones por este cáncer, iniciado con 4,280 muertes en el año de 1990 y terminado con 4 620 en el 2000, lo que representa un notable aumento en la incidencia y mortalidad registrada con un promedio de una mujer fallecida cada dos horas a causa de esta enfermedad, con un crecimiento promedio anual de los casos absolutos de mortalidad de 0.76%. De acuerdo a estas cifras, el CaCU es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres de México¹⁰.

1.5 El VPH y el CaCU.

El VPH ha sido implicado en el 99.7% de los casos de CaCU a nivel mundial.

Hay más de 30 tipos genitales de VPH que son transmitidos a través del contacto sexual.

Sin embargo cuatro de éstos son los más comúnmente encontrados en la mayoría de los

casos de CaCU: VPH-16, VPH-18, VPH-31 y VPH-35¹. De hecho, el VPH-16 se ha encontrado en poco más de la mitad de los casos de CaCU en Estados Unidos y Europa².

La figura 1.4 muestra el modelo de infección del VPH y los factores y cofactores coadyuvantes de la infección, que de no ser eliminada derivará en la generación de lesiones intraepiteliales, pudiendo incluso llegar a CaCU invasivo.

No de Muestras	Tipo de HPV	%	No de Muestras	Tipo de HPV	%
124	59	4.0%	14	73	0.5%
99	52	3.2%	13	70	0.4%
65	16	2.1%	12	71	0.4%
50	31	1.6%	12	83	0.4%
43	39	1.4%	11	33	0.4%
40	51	1.3%	8	35	0.3%
39	56	1.3%	8	42	0.3%
35	53	1.1%	7	54	0.2%
35	58	1.1%	7	72	0.2%
31	18	1.0%	6	68	0.2%
30	62	1.0%	6	MM9	0.2%
26	66	0.8%	5	55	0.2%
25	84	0.8%	4	IS39	0.1%
23	61	0.7%	4	MM7	0.1%
22	45	0.7%	4	MM8	0.1%
22	CP6108	0.7%	3	11	0.1%
20	6	0.6%	3	40	0.1%
20	81	0.6%	1	60	0.0%
18	69	0.6%	1	82	0.0%
15	67	0.5%			

Figura 1.1 Incidencia del VPH en Monterrey. La tabla muestra la prevalencia encontrada en este estudio del 2002, donde resalta el tipo 59, ya que ocupa el primer lugar de prevalencia con un 4.0% del total de la población estudiada. Los tipos 16 y 18 ocupan el 3^{er} y 10^o, lugar respectivamente.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.6 Factores de riesgo para infección por VPH.

La relación entre infecciones genitales con el VPH y el CaCU fue demostrada durante la década de 1980 por el virólogo alemán Harold zur Hausen. Desde entonces, esta asociación ha sido fuertemente establecida.

Estudios epidemiológicos conducidos durante los pasados 30 años han indicado asiduamente que el CaCU es fuertemente influido por las variables relacionadas a la actividad sexual, ya que a mas temprano el inicio de ésta, aumenta la probabilidad de exposición a los principales factores de riesgo¹¹, tales como:

- ✓ Mayor número de parejas
- ✓ Uso prolongado de anticonceptivos orales
- ✓ Factor masculino (pareja con múltiples compañeras sexuales)
- ✓ Paridad

La magnitud de la asociación entre el VPH y el CaCU es mayor que la encontrada entre el tabaquismo y el cáncer de pulmón. Por cierto, dicho sea de paso, el tabaquismo ha sido un muy bien conocido cofactor de riesgo para el CaCU. Un efecto directo del tabaco en el CaCU ha sido establecido debido a los hallazgos de metabolitos de la nicotina encontrados en el moco cervical de las fumadoras⁸.

El número de hijos paridos es un factor de riesgo consistente en el cáncer cervical.

Por otro lado, hay una asociación entre el CaCU y el uso prolongado de anticonceptivos orales. Esta asociación fue observada en estudios en los cuales las lesiones precancerosas se obtuvieron como resultado de la detección ginecológica, ya que las mujeres que utilizan anticonceptivos orales acuden frecuentemente a examinación ginecológica, por lo que la detección, en estadios tempranos fue mayor en aquellas que los utilizan¹².

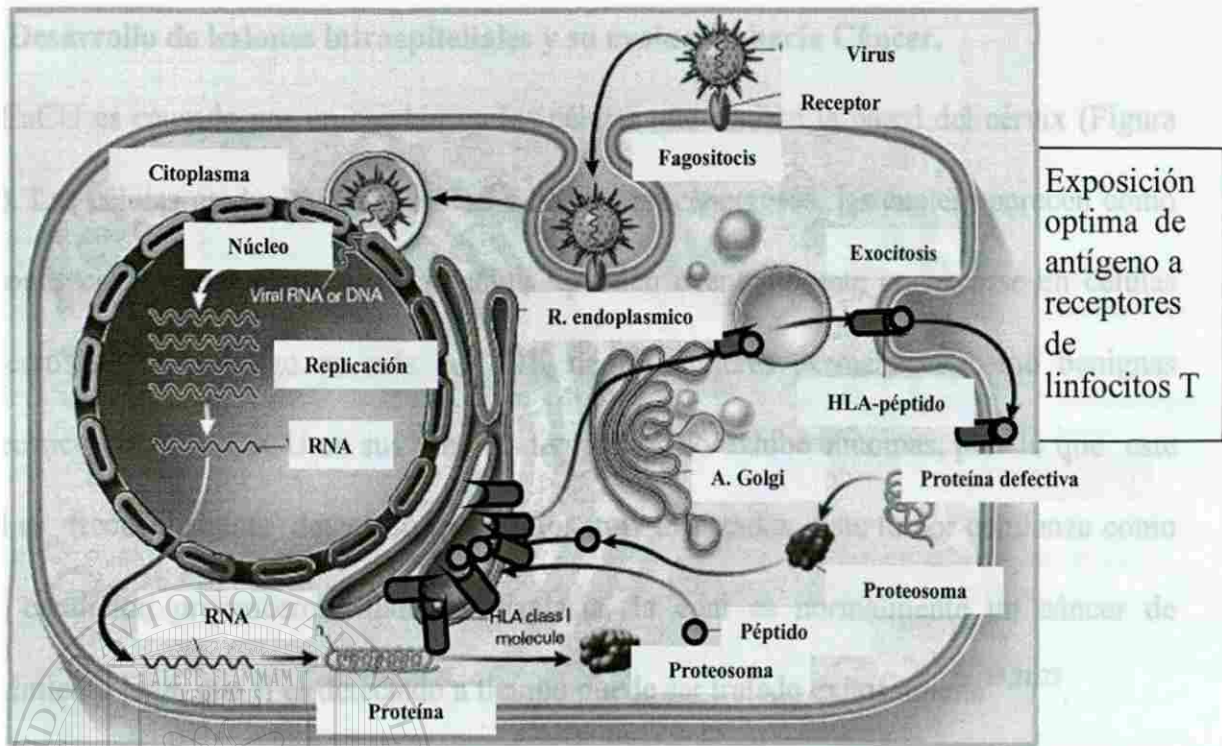
La evidencia de un efecto de la dieta en el riesgo de CaCU, indica que un ingesta elevada de alimentos que conteniendo beta caroteno y vitamina C, además de una disminución de vitamina A, puede reducir el riesgo de padecer esta enfermedad¹²

1.7 Factores de susceptibilidad y persistencia de la infección por VPH.

Después de un período de latencia, la infección con VPH de alto riesgo termina en la progresión a CaCU en un porcentaje muy pequeño de los casos¹². Un alto porcentaje de las mujeres infectadas eliminan el virus utilizando la maquinaria del sistema inmunológico¹³. Por esta razón, se ha demostrado que el aspecto inmunológico y genético del huésped juega un papel preponderante en el curso de la infección. Ciertos polimorfismos en los genes del MHC (Mayor Histocompatibility Complex, también referido como Human Leukocyte Antigens o HLA), se han asociado con la susceptibilidad genética a CaCU. Muchos de estos polimorfismos están localizados en los genes del locus HLA, los cuales codifican para las moléculas de superficie celular clase I (HLA-A, -B, -C) y clase II (HLA-DR, -DQ, -DP). Las moléculas de la clase I están presentes en todas las células nucleadas, las cuales están encargadas de presentar antígenos peptídicos a los linfocitos T CD8⁺. Por otra parte, las moléculas de la clase II están presentes sólo en las células presentadoras de antígenos. El hecho de que los polimorfismos cambien la afinidad de estas moléculas por los antígenos peptídicos del VPH, hace muy probable que resulte en una disminución de la respuesta inmunológica celular contra la infección por el VPH^{14,15,16} (Figura 1.6). Por otro lado, también se ha intentado establecer una relación entre polimorfismos de otras moléculas (p53, IL-10, etc.) y la susceptibilidad con el desarrollo de CaCU,^{9,15,17,18,19,20}.

“Seguimiento a tres años de mujeres asintomáticas portadoras del virus del papiloma humano”

a)



b)

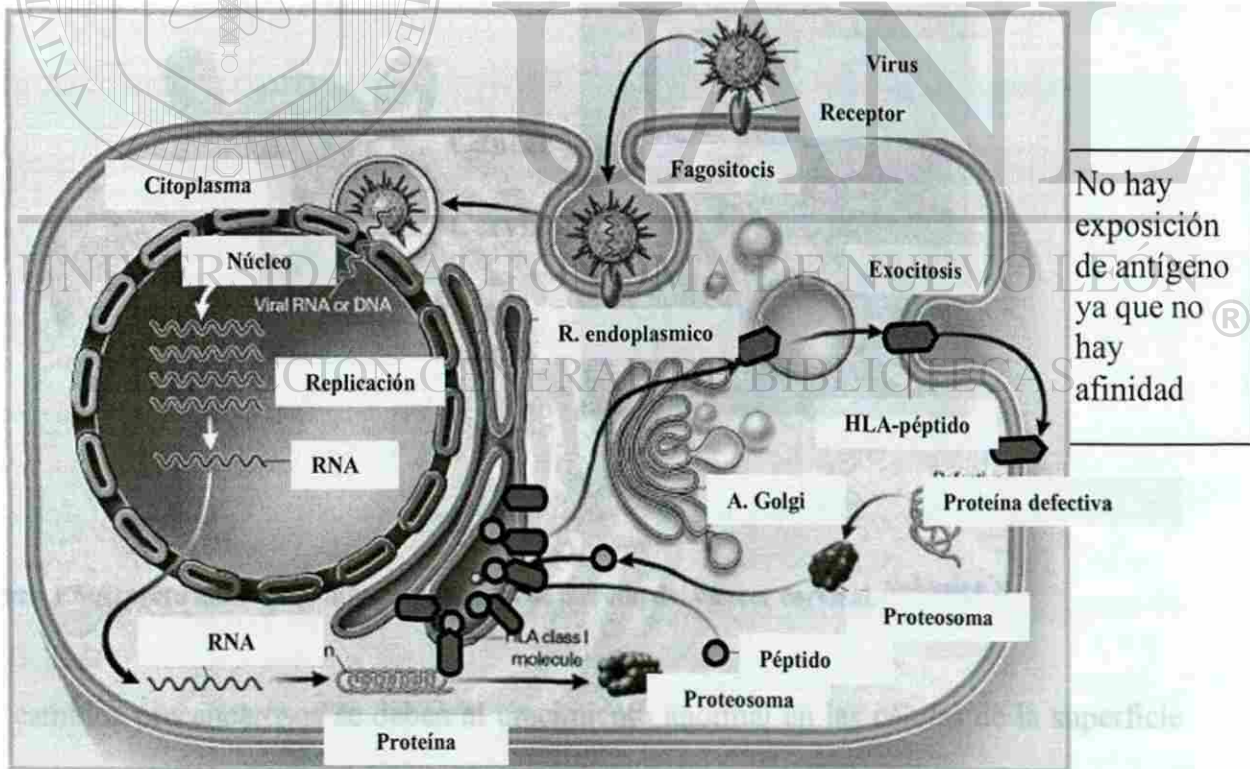


Figura 1.5 Posibles consecuencias de los polimorfismos en los genes del HLA. a) De manera natural una vez que algún patógeno entra en la célula, las moléculas de la clase I reconocen los antígenos producidos por proteosoma que degrada las estructuras virales. Las moléculas de la clase I llevan los antígenos hasta la superficie celular para ser reconocidos por los linfocitos T. b) Algunos polimorfismos cambian la estructura de estas moléculas de la clase I y por lo tanto ya no reconocen de igual manera a los antígenos producidos, por lo que no se lleva a cabo un buen reconocimiento de estos antígenos por los receptores de los linfocitos T.

Modificado de 6

1.8 Desarrollo de lesiones intraepiteliales y su evolución hacia Cáncer.

El CaCU es causado por un cambio en las células que limitan la pared del cérvix (Figura 1.8). Las células gradualmente cambian a células precancerosas, las cuales aparecen como lesiones en la pared cervical. Estas células pueden eventualmente convertirse en células cancerosas, sin embargo en más del 50% de las mujeres permanecen como benignas (precancerosas). El CaCU en sus estadios tempranos no exhibe síntomas, por lo que este mal es frecuentemente detectado en estadios muy avanzados. Este tumor comienza como una condición precancerosa llamada displasia, la cual es normalmente un cáncer de crecimiento lento que si es detectado a tiempo puede ser tratado exitosamente^{15,21,22}.

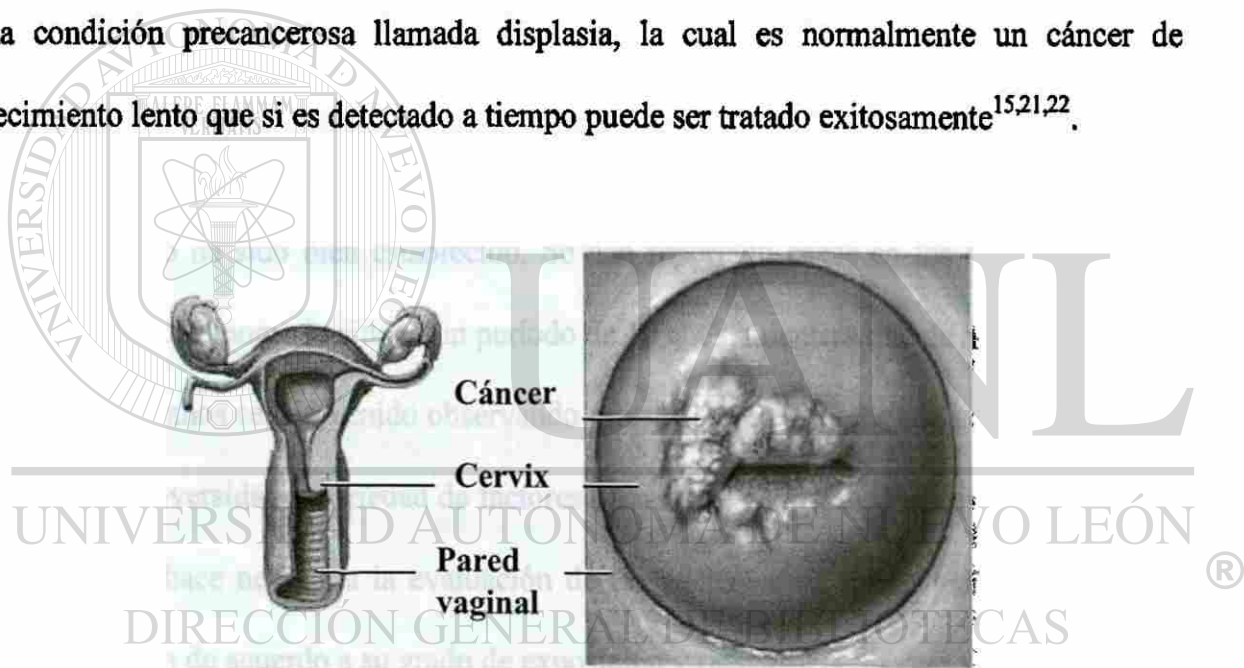


Figura 1.6 Aspecto anatómico microscópico del desarrollo del cáncer cervical. Modificado de 38

Lo cambios precancerosos se deben al crecimiento anormal en las células de la superficie del cérvix y que no llegan a ser cáncer, conociéndosele como "displasia"^{21,23,24}. Estos cambios se clasifican de acuerdo al número de células que se ven afectadas, según la descripción de la figura 1.7.

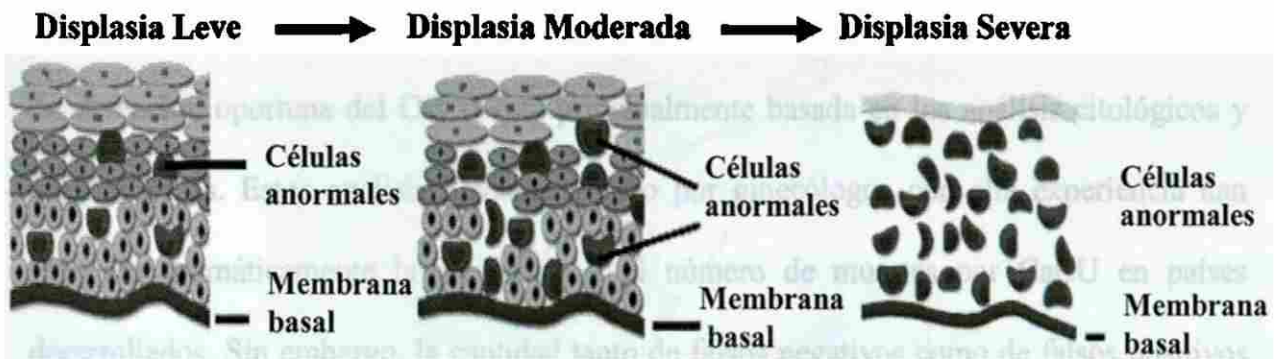


Figura 1.7 Etapas en el desarrollo histológico microscópico del cáncer cervical. El esquema muestra la forma de aparición de células precancerosas y que posteriormente llegan a formar lesiones pre- y cancerosas. Modificado de 37

El tiempo necesario para el desarrollo de estas lesiones a partir de una infección cervical con el VPH no ha sido bien establecido. Se han reportado casos en los que la infección progresa a un carcinoma in situ en un período de 10 años, mientras que de manera contraria en los últimos años se han venido observando estos casos en mujeres con edades entre 18 y 24 años. La diversidad y variedad de factores (genético-ambientales) que pueden influir en dicho tiempo hace necesaria la evaluación de las pacientes en forma individual a fin de tratar cada caso de acuerdo a su grado de exposición y riesgo.

1.9 Métodos de diagnóstico para la detección de lesiones intraepiteliales.

La detección oportuna del CaCU está principalmente basada en los análisis citológicos y colposcópicos. Estos análisis llevados a cabo por ginecólogos con alta experiencia han reducido dramáticamente la incidencia y el número de muertes por CaCU en países desarrollados. Sin embargo, la cantidad tanto de falsos negativos como de falsos positivos en los países en vías de desarrollo de estos dos análisis, han fundamentado la necesidad de nuevas técnicas para la detección oportuna de este tumor con una mayor sensibilidad y especificidad.

1.9.1 Papanicolaou.

La citología de Papanicolaou es un examen que se utiliza para identificar señales indicadoras de cambios citológicos-morfológicos de CaCU. Durante una tinción de Papanicolaou se obtiene una muestra de células del cérvix para examinarla. Estas células son tomadas utilizando un palillo de madera con un algodón en la punta, el cual se frota sobre la superficie del cervix y arrastra una muestra de células, las cuales son colocadas sobre una laminilla y mandadas al laboratorio de patología para su análisis (Figura 1.9).

Las células en la laminilla se evalúan para detectar signos de que están cambiando su morfología normal. Las células atraviesan una serie de cambios antes de que evolucionen a cáncer. Las anomalías morfológicas detectadas pueden ser, entre otras: células atípicas (coilocitos), cambios precancerosos en el tejido (neoplasia intraepitelial cervical), ó carcinoma invasivo (cáncer). Una tinción de Papanicolaou puede mostrar que éstas atraviesan estos cambios mucho antes de que se desarrolle el cáncer²¹.

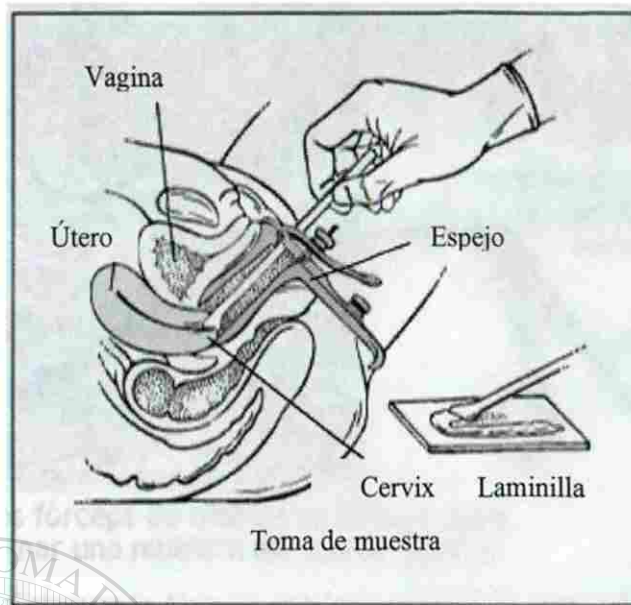
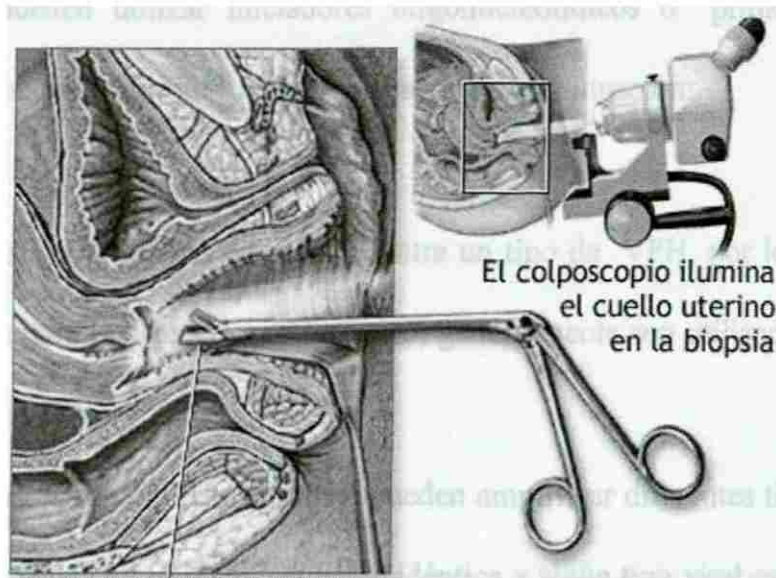


Figura 1.8 Papanicolaou. Imagen que muestra la zona donde se toma la muestra utilizada para la detección de alteraciones celulares en el cuello de la matriz. Tomado de 6

1.9.2 Colposcopia.

La colposcopia es un procedimiento médico en el cual se utiliza un microscopio especial (llamado colposcopio) para observar y examinar vía vaginal detenidamente el cuello uterino (la abertura del útero o matriz) (Figura 1.10). El colposcopio magnifica o amplía la imagen de la parte exterior del cuello uterino. A veces se extrae una pequeña muestra de tejido (llamada *biopsia*) para efectuar estudios adicionales en caso de observar anomalías o signos de lesión. Las muestras de tejido son llevadas a patología, cuyo diagnóstico conlleva a la decisión del tratamiento adecuado de cada paciente, ya que si se establece tempranamente el diagnóstico del tumor, o de un cambio precanceroso en las células, éste puede ser tratado y casi siempre curado. Sin embargo, en casos de lesiones y cánceres tempranos del cuello uterino, el único tratamiento adecuado es la extirpación de una parte del cérvix.



Los fórceps de biopsia se utilizan para tomar una muestra del cuello uterino

Figura 1.9 Técnica de Colposcopia. Consiste en la utilización de un colposcopio para observar la presencia de lesiones y así poder tomar una biopsia a partir de estas anomalías. Tomado de 6

Los hallazgos anormales durante una colposcopia pueden ser: patrones anormales en los vasos sanguíneos, parches blanquecinos (visibles por la aplicación de ácido acético en la zona de la lesión) en el cuello uterino y áreas inflamadas, erosionadas o atróficas (tejido desgastado). Cualquiera de estas anomalías puede indicar cambios precancerosos y cancerosos.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.9.3 Detección del ADN viral.

La detección de tipos específicos del VPH como agente causal del CaCU y de sus lesiones precursoras, ha permitido el desarrollo de nuevos métodos para su diagnóstico temprano. La presencia del ADN viral ha podido establecerse mediante hibridación y reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés)^{4,21,25,26,27,28,29}. Estas estrategias, aunadas a los métodos citológicos, aseguran una mayor precisión en la detección oportuna del cáncer y una marcada disminución de falsos negativos. En la detección por PCR del

“Seguimiento a tres años de mujeres asintomáticas portadoras del virus del papiloma humano”
ADN viral se pueden utilizar iniciadores oligonucleotídicos o “primers” específicos, degenerados o mezclas de primers, según se describe a continuación:

- a) *Primers específicos*: Son diseñados contra un tipo de VPH, por lo que no pueden ser usados para la detección de otro tipo; generalmente son utilizados en el área de investigación.
- b) *Primers degenerados*: Estos primers pueden amplificar diferentes tipos de VPH, ya que su secuencia no es completamente idéntica a algún tipo viral específico. Se han desarrollado estuches que utilizan este tipo de primers tanto para investigación como para el área clínica.
- c) *Mezclas de primers*: Consisten en múltiples juegos de primers específicos cada uno para cada tipo de una gran variedad de VPHs. Se utilizan para poder aumentar el espectro de tipos virales que puedan ser amplificados.

CAPITULO II

JUSTIFICACIÓN

Dada la gran cantidad de casos y muertes debidas al CaCU en México, es necesario establecer nuevos sistemas para la detección oportuna de esta neoplasia apoyados en las técnicas de la biología molecular, además de distinguir las características epidemiológicas que promueven la progresión a CaCU a partir de una infección con el VPH.

La detección oportuna de la infección y el reconocimiento de los factores ambientales a los que están expuestas las mujeres, no ayudarán a poner en evidencia el grupo de mujeres en los que la infección con el VPH progresara hacia CaCU y se podrá actuar preventivamente

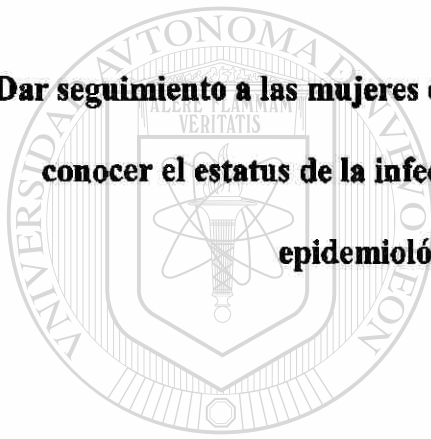
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
a tiempo.
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO III

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Dar seguimiento a las mujeres diagnosticadas en el 2002 como VPH positivas, para conocer el estatus de la infección y su posible relación con las características epidemiológicas de la población estudiada.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Recolectar muestras de suero y cepillado vaginal de mujeres que resultaron positivas (~600) en el estudio llevado a cabo el verano del 2002 para la detección del VPH.
- Obtener el ADN de la muestra cervical y separar para almacenar el suero para futuros estudios.
- Re-examinar el estatus del tejido cervical mediante un segundo estudio.
- Re-examinar la presencia y tipificar al VPH.
- Comparar los resultados obtenidos en la primera tipificación con los obtenidos en esta segunda etapa.
- Analizar los hallazgos a la luz de las características epidemiológicas de la población en estudio.

CAPITULO IV

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Estrategia general

Para el cumplimiento de los objetivos planteados se siguió la siguiente estrategia general:

- 1.- Se localizaron a las pacientes con resultado de VPH positivo (n= 599) de un estudio de prevalencia del VPH que se llevó a cabo en el verano del 2002, para ello se contó con la ayuda de la Secretaría de Salud del Estado de Nuevo León (SSNL).
- 2.- Se citaron a las pacientes a la consulta del Centro Universitario Contra el Cáncer (CUCC) del Hospital Universitario, para tomarles una muestra de cepillado vaginal, la cual se mantuvo en un líquido preservador de células (Precervcyt) a 4°C. También se tomó una muestra de sangre periférica para obtener el suero y guardarlo a -70°C. Además, se les pidió a las pacientes que llenaran un cuestionario para recabar información sobre su exposición a factores de riesgo para la infección por VPH.
- 3.- Una parte del cepillado vaginal se utilizó para realizar un examen de Papanicolau y la otra fue utilizada para extraer el ADN utilizando la técnica de la Proteínasa K.
- 4.- Una vez que se extrajo el ADN, se llevó a cabo una PCR para amplificar la región L1 del VPH, utilizando el par de primers PGMY 09/11 del estuche Amplicor VPH de la compañía Roche.
- 5.- El producto amplificado (PA) fue hibridado sobre las tiras de nylon del kit Amplicor de Roche, las cuales tienen embebidos 27 tipos de VPHs de alto riesgo, lo que clasificó al tipo de VPH presente en la muestra al hibridar con el PA.

“Seguimiento a tres años de mujeres asintomáticas portadoras del virus del papiloma humano”

6.- Una vez obtenido el tipo de VPH y los resultados de los cuestionarios aplicados, se procedió al análisis de los datos generados.

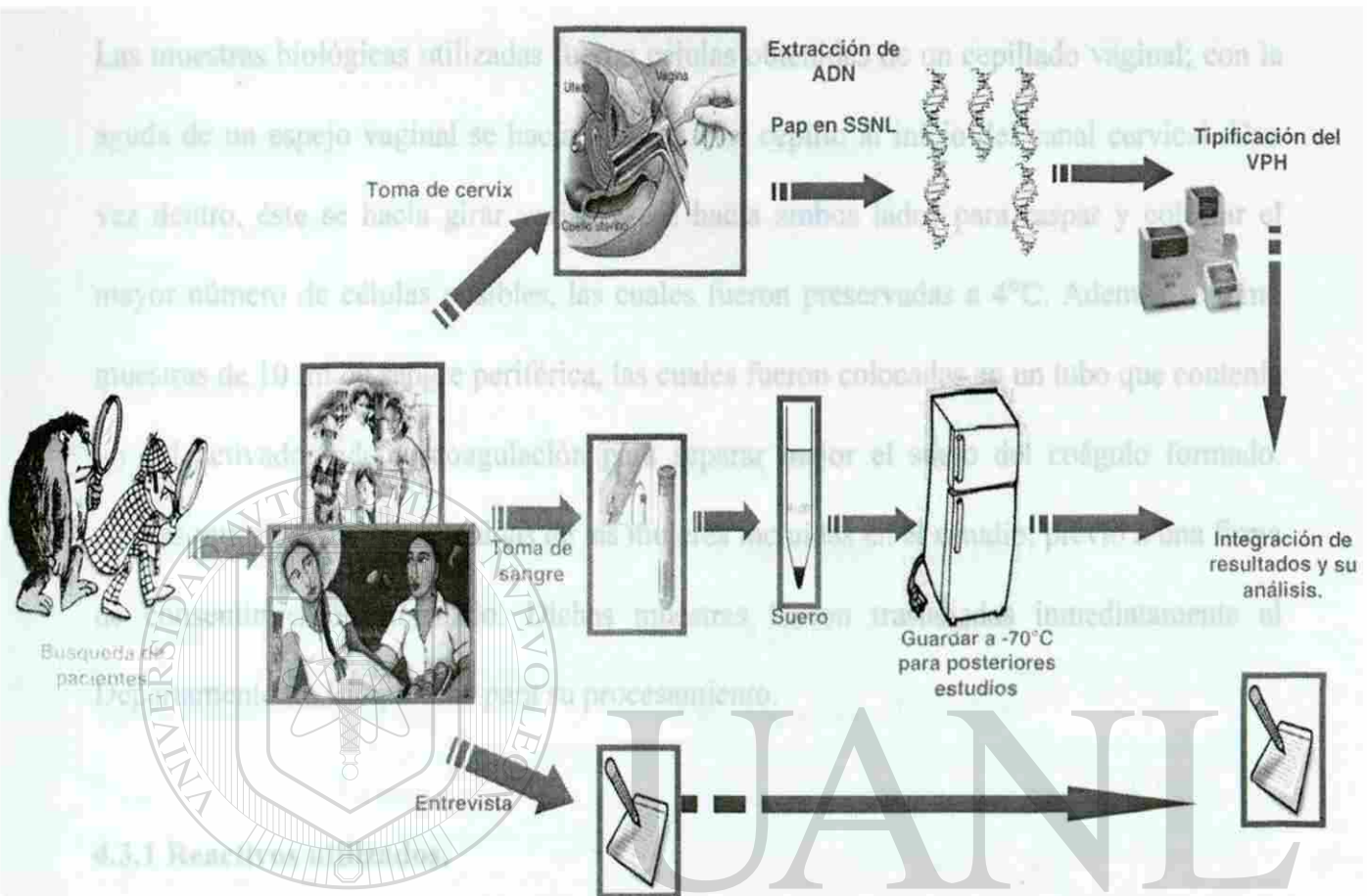


Figura 4.1 Estrategia experimental para el cumplimiento de los objetivos planteados, desde la búsqueda de las pacientes VPH positivas en el verano del 2002 hasta la integración de los resultados obtenidos y su análisis en el 2005.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.2 Lugar de trabajo.

El muestreo fue realizado en el Centro Universitario Contra el Cáncer del Hospital Universitario de la Facultad de Medicina. El trabajo de laboratorio fue llevado a cabo en el laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica de la misma institución.

4.3 Reactivos, materiales y equipos.

Las muestras biológicas utilizadas fueron células obtenidas de un cepillado vaginal; con la ayuda de un espejo vaginal se hacía introducir el cepillo al inicio del canal cervical. Una vez dentro, éste se hacía girar varias veces hacía ambos lados para raspar y colectar el mayor número de células posibles, las cuales fueron preservadas a 4°C. Además se tomó muestras de 10 ml de sangre periférica, las cuales fueron colocadas en un tubo que contenía un gel activador de la coagulación para separar mejor el suero del coágulo formado. Ambas muestras fueron obtenidas de las mujeres incluidas en el estudio, previo a una firma de consentimiento informado. Dichas muestras fueron trasladadas inmediatamente al Departamento de Bioquímica para su procesamiento.

4.3.1 Reactivos utilizados.

Nombre	Fuente
Precerveyt	Cytec Corporation, MA, EUA
SDS	Sigma Chemical Company, MO, EUA
Proteinasa K	Promega, Madison, WI, EUA
Cloroformo	Merck de México
Fenol	Sigma Chemical Company, MO, EUA
Etanol	Merck de México
Tris-EDTA	Sigma Chemical Company, MO, EUA
Acetato de amonio	Sigma Chemical Company, MO, EUA

"Seguimiento a tres años de mujeres asintomáticas portadoras del virus del papiloma humano"

Isopropanol	Merck de México
Agarosa	Sigma Chemical Company, MO, EUA
Ácido acético	Merck de México
Ácido clorhídrico	Merck de México
Kit Amplicor VPH	Roche Inc.

4.3.2 Material utilizado.

Nombre	Fuente
Tubos eppendorf [0.2, 0.5, 1.5 y 2.0 ml]	Cell Associates, TX, EUA
Puntillas	Cell Associates, TX, EUA
Tubos Falcon [15 y 50 ml]	Cell Associates, TX, EUA
Tubos vacutainer [10 ml]	Becton Dickinson and company, NJ, EUA
Cepillos vaginales	DM S.A. de C.V., México, DF
Guantes de látex	Cell Associates, TX, EUA

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.3.3 Equipo.

Nombre	Fuente
Micro-centrífuga mod. 5412	Eppendorf, Hamburgo, Alemania
Centrífuga TJ6	Beckman, Dubuque, Iowa, EUA
Balanza Granataria mod. 1206	Saetorius MP, Alemania
Thermomixer mod. 5436	Eppendorf, Hamburgo, Alemania
Termociclador PTC-100	MJ Research, NJ EUA

"Seguimiento a tres años de mujeres asintomáticas portadoras del virus del papiloma humano"

Cámara de electroforesis	Fotodune, Hartland, WI, EUA
Baño de temperatura	Lab-line Instruments Inc. IL, EUA
Fuente de poder Mod. 250	Gibco-BRL, MD, EUA
Fotodocumentador	Gel Doc 1000, CA, EUA
Vórtex Mod. 37600	Thermolyne, Iowa, EUA

4.4 Métodos

4.4.1 Localización de las pacientes y toma de muestra (2005)

Se utilizó el banco de datos formado durante la investigación llevada a cabo en el verano del 2002 para identificar a las pacientes con resultado positivo a la infección con el VPH. Este banco contiene los nombres y códigos utilizados ese mismo año. Estos últimos, fueron entregados a la Secretaría de Salud de Nuevo León para que los convirtieran en direcciones y teléfonos de las pacientes. Así fueron localizadas las pacientes y referidas al Centro Universitario Contra el Cáncer.

4.4.2 Extracción de ADN a partir de cepillado vaginal

Se agitó la muestra en vortex por 1 minuto. Posteriormente se tomó 1 ml y se colocó en un tubo de 2 ml para centrifugarla por 10 min a 14,000 rpm. Se vació el sobrenadante y se observó que la pastilla se encontraba en el fondo del tubo. Se agregó 1 ml de TE 9X, 60 µl de proteinasa K (10 mg/µl) y 40 µl de SDS al 10%, y se incubó a 56°C por 2 horas con agitación fuerte en el thermomixer (1000 rpm). Posteriormente la muestra se incubó a 95°C por 15 min en el thermomixer (1000 rpm). Se le agregó 500 µl de fenol y 500 µl de

“Seguimiento a tres años de mujeres asintomáticas portadoras del virus del papiloma humano”

cloroformo y se agitó en vortex por 5 min, hasta que se observó una emulsión. Se centrifugó por 10 min a 14, 000 rpm, y la fase acuosa se colocó en otro tubo de 1.5 ml. Se repetía la extracción fenol-cloroformo solo si se considera necesario. La fase acuosa se colocó en un tubo falcón de 15 ml y se agregó 353 μ l de acetato de amonio 8M y 2.5 volúmenes de etanol al 100%. Esto se incubó para precipitar el ADN a -70°C por 1 hora. En un tubo de 1.5 ml se centrifugó la muestra de 1.5 en 1.5 ml hasta centrifugar el volumen de la muestra en su totalidad (8 min a 14,000 rpm). Después se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70% y esto se centrifugó por 8 min a 14,000 rpm (se decantó). Se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente (de 1 a 2 horas) y se resuspendió en 100-200 μ l de TE 1X, posteriormente se almacenó el ADN a -70°C .

4.4.3 *Análisis electroforético del ADN.*

Una vez que se extrajo el ADN, este se colocó en un gel de agarosa al 0.8% para observar su calidad, se tiñó con bromuro de etido y se observó en el Fotodocumentador.

4.4.4 *Amplificación de la región L1 del VPH*

La mezcla de reacción de 60 μ l contenía cerca de 500ng de ADN, 200mM de cada dNTP, 0.9 unidades de Taq. Gold y 100pmoles de cada par de primers. Un par de primers amplificaba la región L1 del genoma del VPH y el segundo par de primers amplificaba el gen de la β -globina del genoma de las pacientes y que era usado como un control de calidad de la extracción del ADN. La mezcla fue sujeta a 40 ciclos de amplificación usando un PTC-100 thermal cycler (MJ research). Cada ciclo incluía 30 segundos a 94°C (Desnaturalización), 30 segundos a 55°C (Alineamiento) y 30 segundos a 72°C (Extensión). Los Productos de PCR fueron pasados a una tira de nylon la cual contenía

sondas con los diferentes tipos de VPHs por lo que el producto amplificado se hibridaba con la sonda que correspondía al tipo de VPH amplificado de la muestra tomada.

4.4.5 Hibridación con sondas específicas para detección y tipificación de VPH

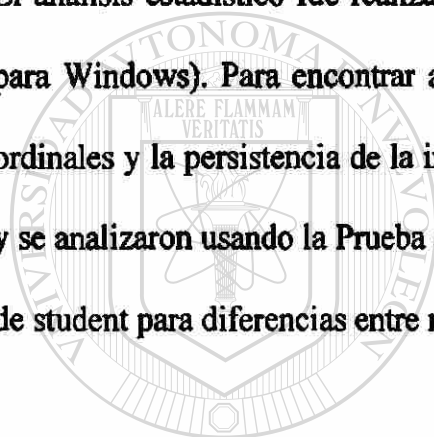
A 50 μ L de producto amplificado se le añadió 50 μ L de solución desnaturalizante y se incubó durante 10 min. Las soluciones de hibridación y lavado se preparaban y colocaban a 53°C. Se marcaban las tiras con la clave del paciente y se depositaban en una charola de hibridación. A cada tira se le añadió 3ml de la solución de hibridación caliente y posteriormente se agregó 100 μ L de la mezcla de producto amplificado-solución desnaturalizante para incubar todo a 53°C por 30min en baño de agua. Se eliminó la solución de hibridación por aspiración con un sistema de vacío. Se agregaron 3 ml de la solución de lavado (a temperatura ambiente) e inmediatamente se eliminaron mediante aspiración. Después se añadieron 3ml de solución de lavado caliente y se incubó en baño de agua a 53°C durante 15min. Mientras transcurría este tiempo se preparaba la solución de conjugado (SA-HRP). Transcurrido el tiempo se eliminó la solución de lavado mediante aspiración y se agregaron 3ml del conjugado, para incubar a temperatura ambiente durante 30 min con agitación constante (70rpm). Se preparaban la solución de citratos. Después se realizó 1 lavado rápido y posteriormente se agregaron 3ml de solución de lavado, esto se puso en agitación a temperatura ambiente durante 10min. Posteriormente se aspiró y agregaron 3ml de solución de lavado, de nuevo esto en agitación a temperatura ambiente durante 10min. Se añadieron 3ml de la solución de citratos y se dejó en reposo (mínimo 5 min), mientras se preparaba la solución de color (sustrato A + sustrato B) protegiendo los vasos de precipitado de la luz con papel aluminio. Se eliminó la solución de citratos por

“Seguimiento a tres años de mujeres asintomáticas portadoras del virus del papiloma humano”

aspiración y se agregaron 3ml de la solución de color (sustrato A + sustrato B), para posteriormente ser incubados con agitación a temperatura ambiente durante 5min. Aproximadamente. Finalmente se lavo con agua destilada, se elimino el exceso y se dejo secar a temperatura ambiente. La identificación se realizo utilizando una plantilla que se adquirió con el Kit.

4.4.6 Análisis Estadístico

El análisis estadístico fue realizado usando el paquete computacional SPSS® (versión 13 para Windows). Para encontrar alguna relación tanto entre las variables nominales como ordinales y la persistencia de la infección con el VPH se elaboraron tablas de contingencia y se analizaron usando la Prueba de χ^2 . Para las variables numéricas se realizo la prueba t de student para diferencias entre medias.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



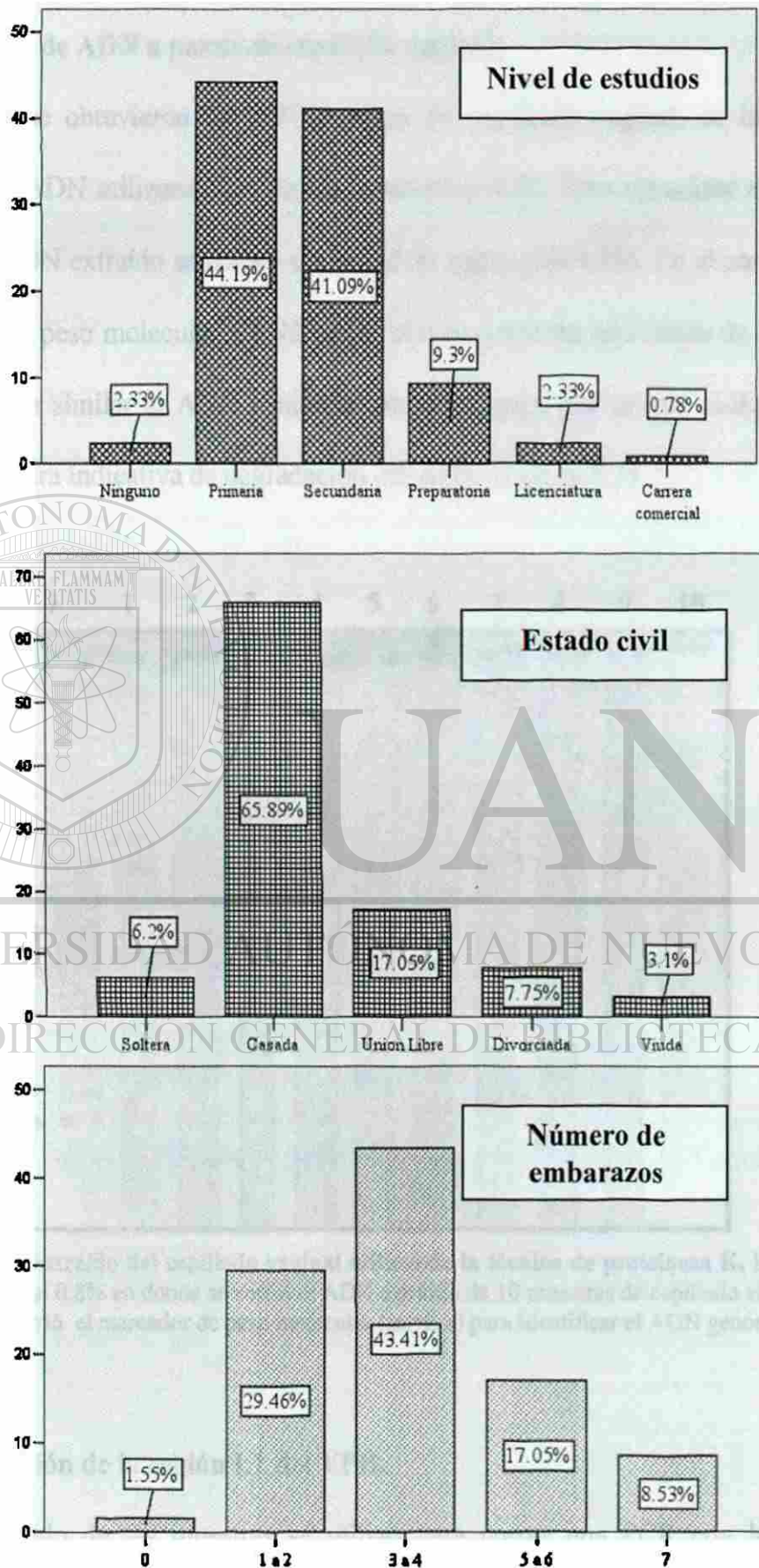
CAPITULO V

RESULTADOS

5.1 Localización de las pacientes y toma de muestra.

Con la ayuda de la Secretaría de Salud de Nuevo León (SSNL) se localizaron 129 de las mujeres VPH positivas participantes en el estudio del 2002 y se citaron para toma de muestras de sueros y cepillados vaginales. La edad promedio del grupo de estudio fue de 39 años \pm 10, con una menarquía a los 12 años \pm 1.7, un inicio de vida sexual a los 18 años \pm 3 y una edad de 20 años \pm 4 durante su primer embarazo. La mayoría de las mujeres reclutadas durante la investigación estaban casadas (65.89%) y referían un nivel de estudio básico (87.61%). Además, la mayoría de ellas había estado embarazadas entre 3 y 4 veces (43.41%) y referían haber tenido entre 1 y 2 parejas sexuales (78.29%). Por otra parte, un porcentaje pequeño de este grupo refería tabaquismo (20.93%). En igual proporción se refirieron al uso de suplementos vitamínicos. La distribución de estas características así como factores epidemiológicos, se encuentran descritos detalladamente en la figura 5.1.

“Seguimiento a tres años de mujeres asintomáticas portadoras del virus del papiloma humano”



Figuras 5.1 Factores de riesgo. Descripción de las características epidemiológicas del grupo de estudio.

5.2 Extracción de ADN a partir de cepillado vaginal.

Una vez que se obtuvieron las 129 muestras de cepillado vaginal, se llevó a cabo la extracción de ADN utilizando la técnica de proteinasa K. Para visualizar su calidad, una alícuota del ADN extraído se colocó en un gel de agarosa al 0.8%. En el carril 1 se colocó el marcador de peso molecular $\lambda + Hind III$, el cual presenta una banda de 23,130 pb que migra en forma similar al ADN genómico no degradado, por lo que cualquier señal por debajo de ésta era indicativa de degradación del ADN (Figura 5.2)

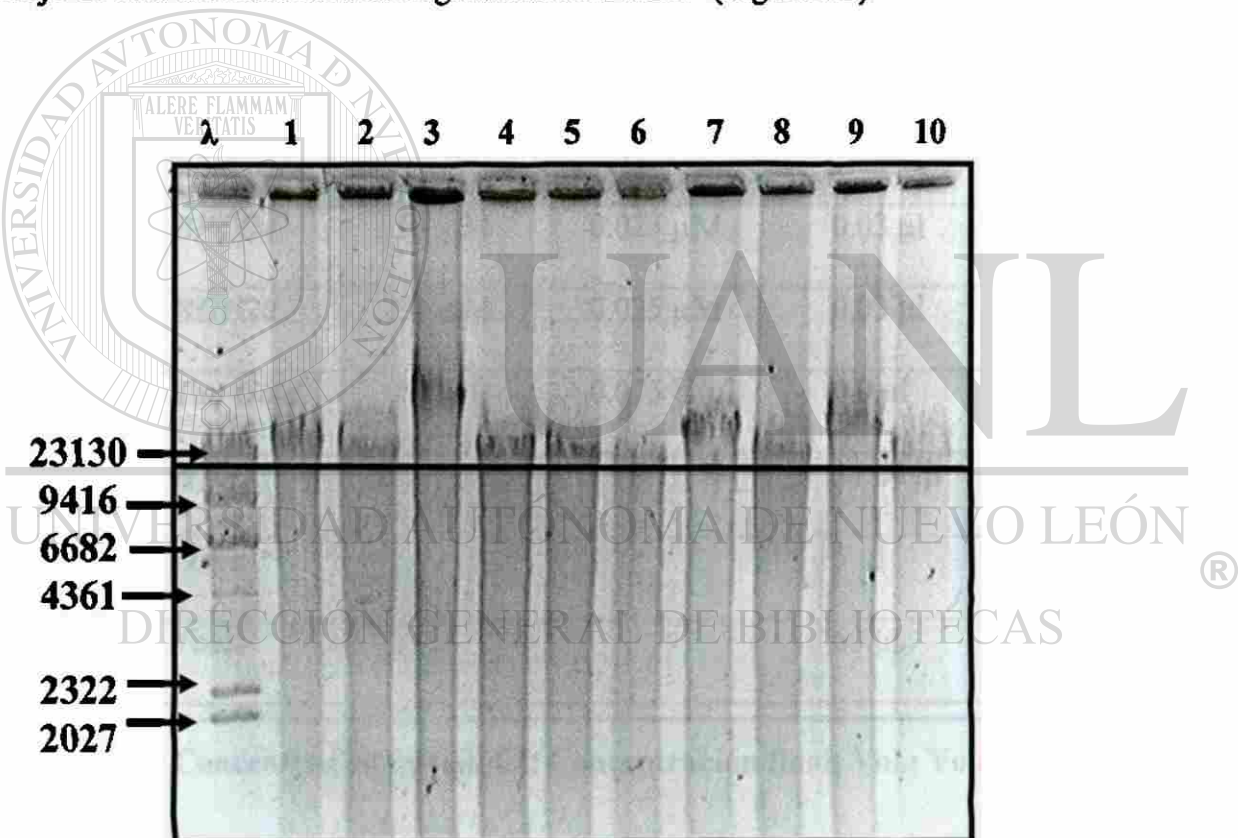


Figura 5.2 ADN extraído del cepillado vaginal utilizando la técnica de proteinasa K. La figura muestra un gel de agarosa al 0.8% en donde se corrió el ADN extraído de 10 muestras de cepillado vaginal (carriles 2-11), además se corrió el marcador de peso molecular (carril 1) para identificar el ADN genómico.

5.3 Amplificación de la región L1 del VPH.

El ADN extraído de las muestras se utilizó para correr una PCR con la finalidad de amplificar la región L1 del VPH, rastreando su presencia. Para la PCR se utilizaron los

“Seguimiento a tres años de mujeres asintomáticas portadoras del virus del papiloma humano”

primers (biotinilados) PGMY09 y PGMY11 del kit Amplicor de Roche, según las concentraciones y condiciones de la PCR que se muestran en las tablas 5.1 y 5.2 respectivamente.

Tabla 5.1 Concentraciones utilizadas en la PCR de la región L1 del VPH.

Reactivo	Ci	Cf	Vol.
<i>Buffer</i>	10X	1X	6.0 µl
<i>MgCl₂</i>	25 mM	4 mM	9.6 µl
<i>dNTPs</i>	10 mM	0.4 mM	1.2 µl
<i>PGMY09</i>	50 µM	1 µM	1.2 µl
<i>PGMY11</i>	50 µM	1 µM	1.2 µl
<i>BPC04</i>	50 µM	0.025 µM	0.03 µl
<i>BGH20</i>	50 µM	0.025 µM	0.03 µl
<i>Taq Gold</i>	5 U/µl	0.075 U/µl	0.9 µl
<i>H₂O</i>			34.84 µl
<i>DNA</i>			5 µl
Total			60 µl

Ci: Concentración inicial; Cf: Concentración final; Vol.: Volumen

Tabla 5.2 Programa del termociclador para amplificar la región L1 del VPH.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	95°	12 min
Desnaturalización	95°	30 s
Apareamiento	55°	1 min
Extensión	72°	1 min
Repetir 40 veces		
Extensión final	72°	5 min

Una vez que se llevó a cabo la PCR, el producto amplificado se resolvió por electroforesis en un gel de agarosa al 2% para visualizar una banda de cerca de 450pb, correspondiente al tamaño esperado de la región de L1 que amplificaban los primers PGMY09/11, lo que indicaría la presencia del VPH en la muestra colectada; así como una banda de 250 pb que correspondía al gen de la β - globina humana, lo que indicaría una buena extracción de ADN y que la reacción de PCR se había llevado a cabo eficientemente. La figura 5.3 muestra uno de dichos geles, el carril 1 muestra el marcador $\lambda + Pst I$, utilizado como guía para localizar las bandas de 450 y 250 pb de los genes L1 y de la β - globina humana, respectivamente. En el carril marcado con el numero 5 se observa una muestra positiva para VPH, la cual presenta una banda de 450 pb, mientras que el resto de los carriles son muestras negativas para la banda de 450 pb.

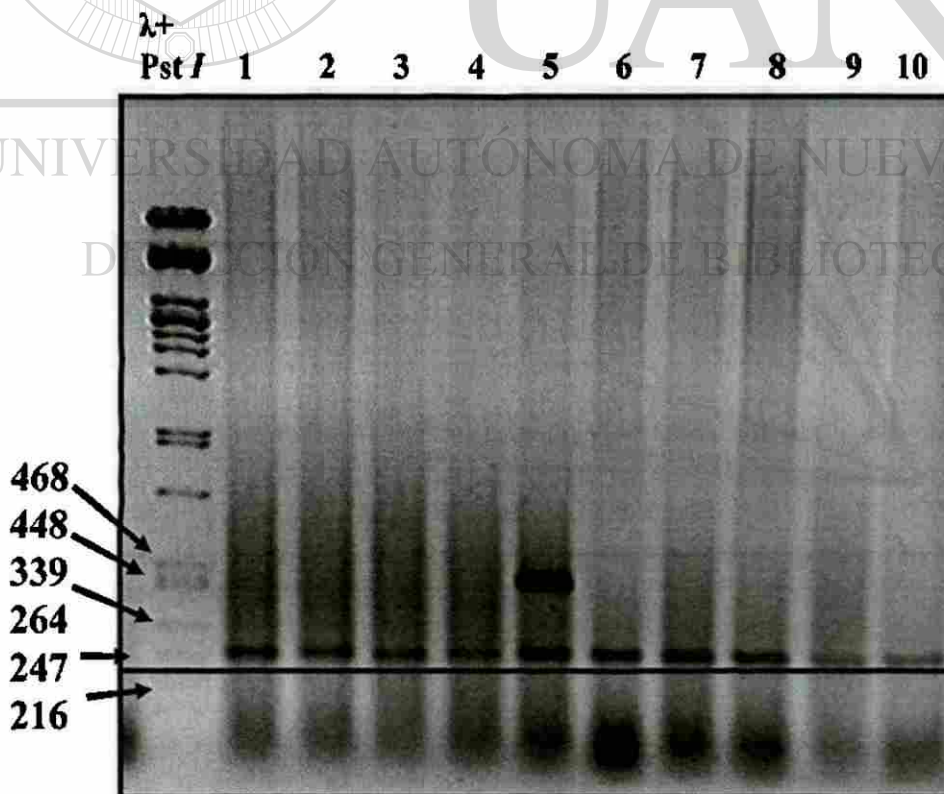


Figura 5.3 Resultado de la amplificación de la región L1 del VPH. La figura exhibe 10 muestras de diferentes pacientes sometidas a la amplificación del gen L1, la muestra del carril numero 5 es positiva la presencia del VPH en la muestra colectada.

5.4 Hibridación con sondas específicas para detección y tipificación de VPH.

Los productos amplificados (PA) fueron hibridados sobre las tiras de nylon del kit Amplicor de Roche, las cuales tienen embebidas 27 tipos de sondas, una para cada tipo de VPH de alto riesgo oncogénico, por lo que las muestras que presentaron infección con VPH dieron positivo a la hibridación y ésta reveló el tipo de VPH presente en la muestras. La figura 5.4 muestra las tiras de nylon del Kit Amplicor de Roche de algunas muestras indicando la presencia del gen de control interno (β - globina) en todas ellas y del VPH. Para la tipificación se utiliza un molde que indica el tipo de VPH al que corresponde la altura de la banda encontrada.

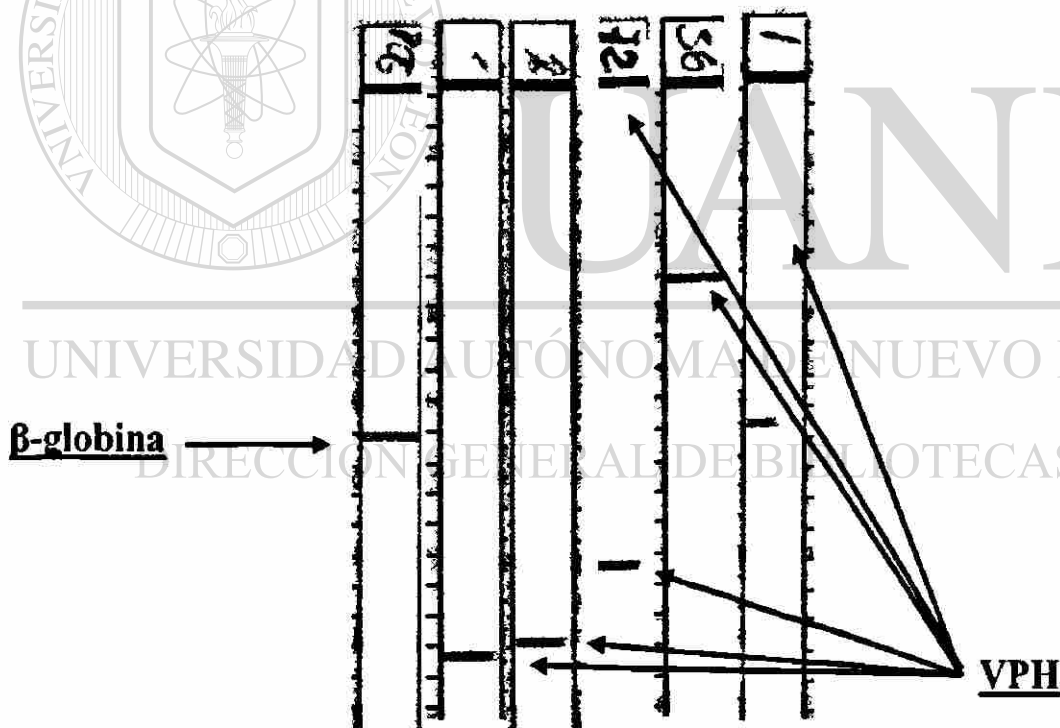


Figura 5.4 Detección y tipificación del VPH. La figura muestra diferentes tiras sobre las que se revela la presencia y tipificación del VPH detectado por PCR

5.5 Análisis de resultados.

5.5.1 Incidencia de infección por VPH en la población de estudio.

En esta segunda detección (2005) se encontró que el 21% (n= 27) de las mujeres estudiadas presentaba una infección con el VPH, mientras que el 79% (n= 102) restante la habían eliminado.

5.5.2 Tipificación y prevalencia con relación a los hallazgos del 2002.

Al llevar a cabo la tipificación, se encontró que la prevalencia en esta segunda etapa (2005) era diferente a la encontrada tres años atrás. Mientras que entonces el virus tipo 83 (bajo riesgo oncogénico) se encontró en el 7° lugar de prevalencia, en este segundo tamizaje se encontró en el 1^{er} lugar. Los tipos de alto riesgo 18 y 16 se encontraron en ambas detecciones en los primeros lugares de prevalencia. Por otra parte, el virus de alto riesgo tipo 59, el cual había sido el más prevalente en el 2002, se encontró en el 11° lugar en esta segunda tipificación, lo que indica que la infección con este tipo de virus fue eliminada por la mayoría de las mujeres (n= 28). Interesantemente, todas las infecciones con el VPH tipo 52 (2^{do} lugar de prevalencia en el 2002) fueron eliminadas, no encontrándose casos con este tipo de virus en el 2005. (Figura 5.5).

"Seguimiento a tres años de mujeres asintomáticas portadoras del virus del papiloma humano"

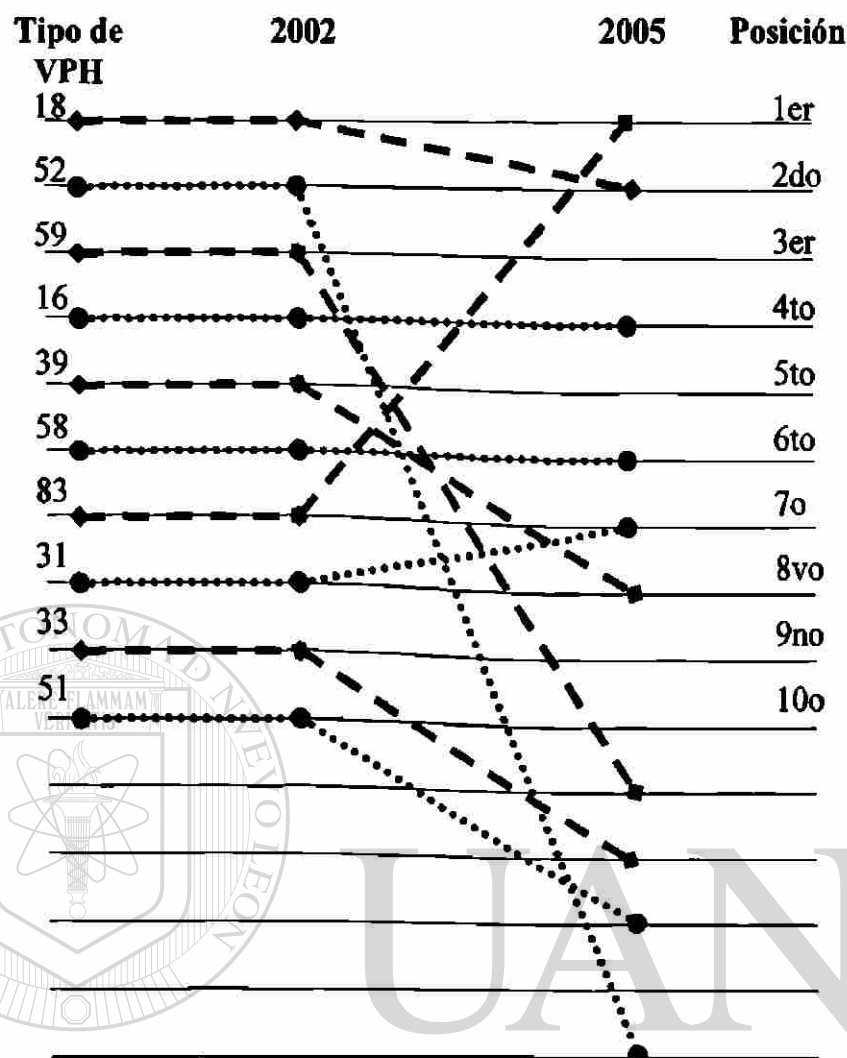


Figura 5.5 Comparativa de la prevalencia del VPH detectada tras las tipificaciones del 2002 y 2005. La figura muestra los cambios de posición en las prevalencias de los tamizajes realizados en estas dos etapas de la investigación.

5.5.3 Persistencia, reinfección y eliminación del VPH.

Del 100% (n=129) de las pacientes tipificadas en el 2005, sólo en el 21% (n= 27) se detectó la presencia del VPH. Al analizar el tipo de VPH presente en esta segunda detección con respecto al resultado de la primera, se encontró que el 52% (n= 14) de estas infecciones eran ocasionadas por el mismo tipo de VPH presente tres años atrás, lo que indicó una infección persistente, mientras que el 48% (n= 13) de las mujeres infectadas tenían infecciones con un tipo de VPH diferente al encontrado en el verano del 2002. Esto implica

"Seguimiento a tres años de mujeres asintomáticas portadoras del virus del papiloma humano"

que las mujeres habían eliminado la infección presente en ese año, pero habían adquirido una infección con otro tipo de VPH durante este período de tres años. Cabe mencionar que el presente trabajo se enfocó en los resultados de las pacientes con persistencia viral.

Los tipos de VPH con una mayor dificultad para ser eliminados por el huésped se encuentran resumidos en la tabla 5.3, así como el número de casos correspondientes.

Tabla 5.3. Porcentaje de persistencia viral.

Riesgo	VPH	Casos en el 2002	Casos en el 2005	Porcentaje de persistencia
Bajo	81	3	2	66%
Bajo	61	6	3	50%
Alto	33	2	1	50%
Bajo	83	8	3	37%
Alto	18	12	4	33%
Alto	16	12	3	25%
Bajo	42	5	1	20%
Alto	51	5	1	20%
Alto	31	9	1	11%
Alto	39	9	1	11%
Alto	59	29	1	3%

La tabla revela el número de pacientes que permanecieron con el mismo tipo de VPH a través de tres años (2002-2005), y el porcentaje correspondiente. De los tres casos con VPH tipo 81 en el 2002, solo una paciente logró eliminar esta infección y los otros dos casos permanecieron con la infección, lo que denota la dificultad de este virus para ser eliminado. Además, se encontró que de los tipos 81, 61, 33, 83 y 18 los casos presentes en el 2002 (100%, n= 31), sólo unos cuantos eliminaron la infección (58%, n= 18), hecho que se comprobó en la segunda tipificación. A su vez, estos mismos tipos se encuentran en los primeros lugares de prevalencia en el 2005, lo que corrobora su persistencia y por consecuencia la dificultad para ser eliminados.

5.5.4 Factores ambientales asociados con infecciones persistentes por VPH.

Una vez que se agruparon los resultados obtenidos en persistencia y eliminación viral, se realizó el análisis estadístico para determinar alguna influencia de los factores ambientales que pudieran significar un aumento al riesgo de persistencia o eliminación de la infección con el VPH, el cual arrojó los resultados plasmados en la tabla 5.4

"Seguimiento a tres años de mujeres asintomáticas portadoras del virus del papiloma humano"

Tabla 5.4 Predictores de la persistencia de la infección con el VPH

Variable (n:116)	P
Edad al inicio de vida sexual	< 0.001†
Edad 1er Embarazo (años)	0.002†
Estado civil (casada)	< 0.001†
VPH de alto riesgo	0.035*
Infección múltiple	0.023*
Suplementos vitamínicos	0.020*
Edad (años)	NS
Menarquia (años)	NS
No. Embarazos	NS
No. compañeros sexuales	NS
Nivel de estudios (básico)	NS
Tabaco	NS
Otras enfermedades	NS
Met. Anticonceptivo de barrera	NS
Circuncisión en la pareja	NS

†= Altamente significativo; *= Significativo; NS= No significativo.

Factores como la edad de la primera relación sexual, la edad del primer embarazo, la presencia de múltiples VPHs, la presencia de VPHs de bajo riesgo, el consumo de suplementos vitamínicos, así como un estado civil diferente al de casada, están presentes principalmente en el grupo de mujeres que no han podido eliminar la infección con el VPH.

En esta investigación se encontró que los factores medioambientales como la edad temprana al inicio de la vida sexual, la edad temprana durante el primer embarazo y un estado civil diferente al de casada, tiene una muy alta significancia estadística con respecto a la persistencia de la infección con el VPH ($p \leq 0.01$ y un IC del 99%) estas tres características se han utilizado indicadores de la promiscuidad en la mujer. También se encontró una significancia entre la presencia de infecciones con VPH de bajo riesgo, la presencia de infecciones múltiples y el consumo de suplementos alimenticios con las infecciones persistentes ($p \leq 0.05$ y un IC del 95%).

En el presente trabajo no se encontró una relación significativa entre el consumo del tabaco y la persistencia de la infección con el VPH, así como tampoco se observó un efecto de la edad de las pacientes, el número de compañeros sexuales, el número de embarazos, el uso de un método anticonceptivo de barrera, etc., en la persistencia de la infección.

5.5.5 Desarrollo de lesiones por infección con VPH.

Una vez que se tipificó el VPH en la población analizada, ésta se agrupó en mujeres que eliminaron la infección (87.9%, n=102) y con infección persistente (12.1%, n= 14) después de tres años.

Del grupo de mujeres con eliminación de la infección, un porcentaje pequeño desarrolló lesiones (7.8%, n= 8). Las lesiones presentes en este grupo en general fueron de bajo grado, mientras que la mayoría (93.1%, n= 94) no desarrolló ninguna lesión intraepitelial (Figura 5.6).

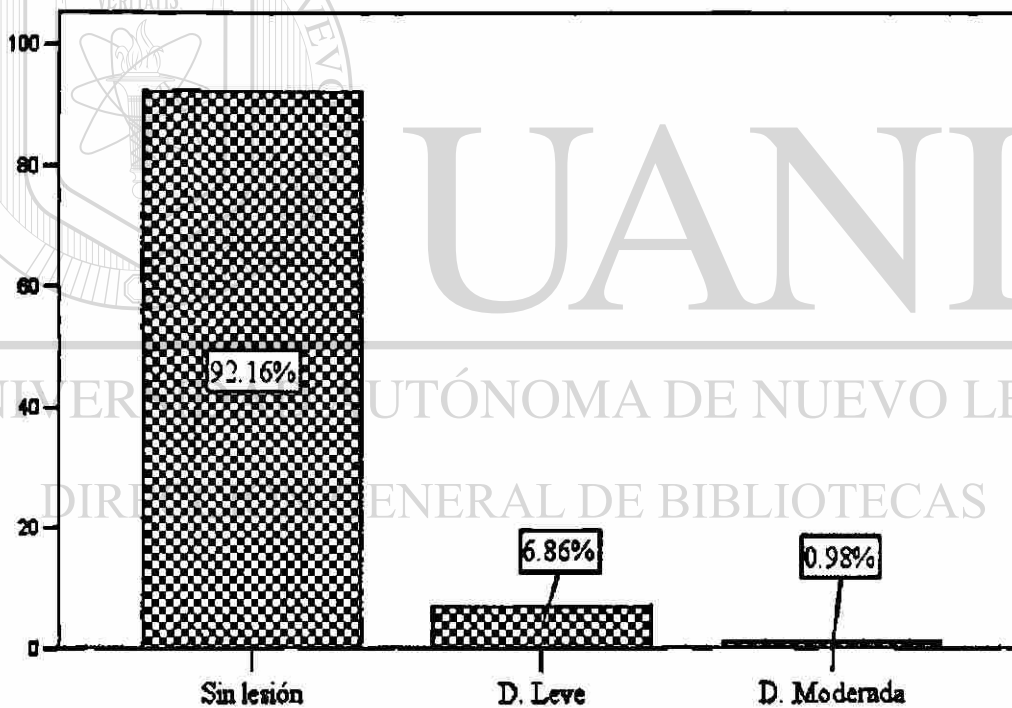


Figura 5.6 Grupo de mujeres que eliminaron la infección.

La gráfica muestra el porcentaje de lesiones encontradas en el grupo de mujeres que eliminó la infección sin tratamiento alguno: el 6.8% (n= 7) de este grupo desarrolló una

“Seguimiento a tres años de mujeres asintomáticas portadoras del virus del papiloma humano”

displasia leve, el 1.0% (n= 1) una displasia moderada, mientras que el 93.1% (n= 94) no desarrolló lesión epitelial.

Por otro lado, en el grupo de mujeres que no logró eliminar la infección después de tres años (12.1%, n= 14), se presentaron mayor número de lesiones epiteliales: el 42.9% (n=6) de ellas presentaron lesiones y todas estas venían acompañadas con una infección por un tipo de VPH de alto riesgo oncogénico, mientras que el 57.1% (n= 8) no desarrolló ningún tipo de lesión, ya que el 62.5% (n= 5) presentaba una infección con tipo de VPH de bajo riesgo oncogénico (61, 81, 83), lo que explica el porqué de la ausencia de lesiones a pesar de mantener un infección por más de tres años (Figura 5.7).

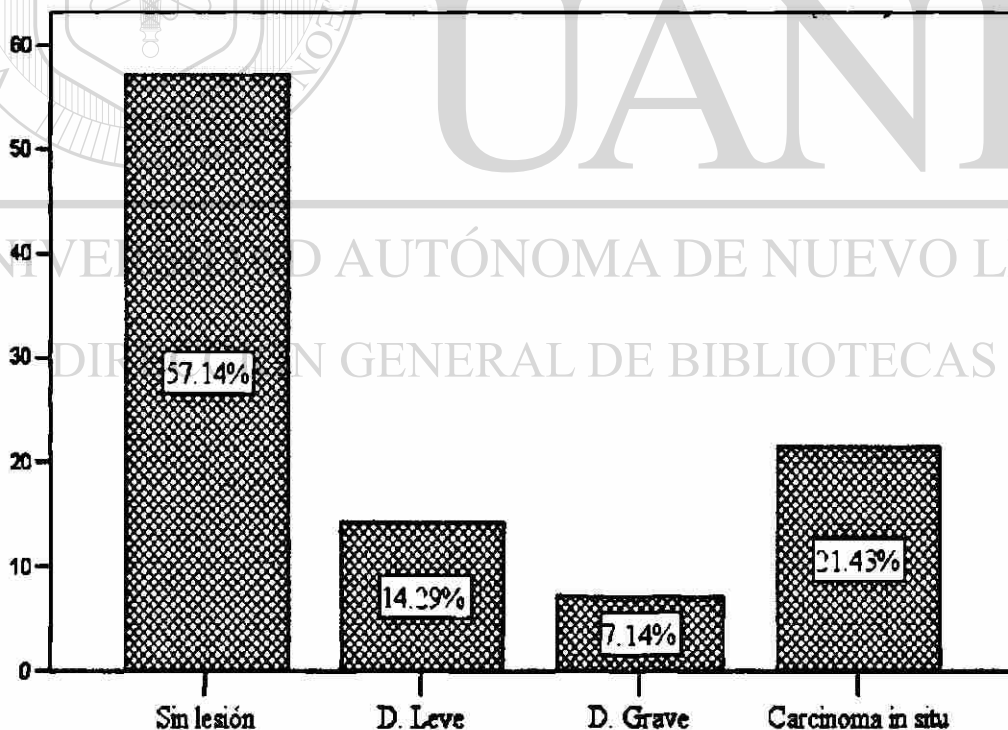


Figura 5.7 Grupo de mujeres con infección persistente.

De las pacientes con lesiones, el 21% (n= 3) presentaron carcinoma in situ, lo que resulta verdaderamente importante, ya que en el 2002 estas mismas pacientes no presentaban ninguna alteración citológica, lo que exhibe una evolución de la infección hacia cáncer (Tabla 5.7).

Tabla 5.5 Lesiones desarrolladas en las pacientes con infección es persistentes.

# Pacientes	Tipo de VPH	Tipo de lesión
2	16	Carcinoma in situ
1	16, 18, 31, 33, 59,	Carcinoma in situ
1	18, 61, 81	D. Grave
1	39	D. Leve
1	45	D. Leve

CAPITULO VI

DISCUSIÓN

El CaCU se encuentra entre las primeras causas de muerte por cáncer en mujeres de países en vías de desarrollo. En México cada hora mueren dos mujeres a causa de esta enfermedad, con un crecimiento promedio anual de los casos absolutos de mortalidad de 0.76%¹⁰. El VPH fue asociado como la principal causa para el desarrollo de CaCU a principios de los 80s³. Por lo que esta investigación se llevó a cabo con el fin de establecer cuáles son los factores epidemiológicos que pudieran aumentar el riesgo de infección por VPH y persistencia de la misma, la generación de lesiones intraepiteliales cervicales y posteriormente CaCU, particularmente en la población del Noreste de México.

Los datos de nuestro laboratorio sobre la prevalencia del VPH en el estudio del 2002, revelaron que el 20% de la población femenina del área metropolitana de Monterrey se encontraba infectada con el VPH durante el verano del 2002. Es conocido que el porcentaje de prevalencia de infección por VPH se conserva a través de los años en una población, puesto que se ha encontrado que hay un promedio de incidencia mensual de esta infección tal y como lo observo Giuliano y cols.³⁰ (2002). A esto se debe que en la tipificación del 2005 se encontró también un 20% de prevalencia del VPH, estos datos muestran similitud a la prevalencia encontrada por Lazcano-Ponce y cols.³¹ (2001) en el estado de Morelos en donde el 14.5% de la población femenina sin lesiones epiteliales presentó una infección con el VPH. Este mismo autor reportó que los tipos 16, 53, 31, 18 fueron los más prevalentes

“Seguimiento a tres años de mujeres asintomáticas portadoras del virus del papiloma humano”

en su estudio. Por otra parte, Gonzales-Losa y cols.³² (2004) encontraron que los tipos 58, 16, 18, 33 y 31 se encontraban entre los primeros lugares de prevalencia en la población femenina de Yucatán. En esta investigación se encontró que los tipos 83, 18, 61, 16, 81 fueron los más frecuentes en esta población, con lo que se observa en estos tres estudios llevados a cabo en el mismo país que los tipos 16 y 18 prevalecen sobre cualquier otro tipo de VPH y son los principales causantes de los casos con CaCU a nivel mundial.

Estudios realizados en Holanda por Nobbemhuis y cols.²⁴ (1999) mostraron que el 67% de las infecciones con el VPH son eliminadas de manera natural sin recibir tratamiento alguno. Datos similares de Mosciki y cols.³³ (1998) en California reportaron que entre un 60 a 75% de las infecciones con el VPH son eliminadas. En el presente estudio los resultados mostraron que el 87.9% de los casos de las infecciones con el VPH fueron eliminadas de manera natural por el sistema inmune de la paciente. Estas cifras son muy parecidas a las reportadas por Evander y cols.³⁴ (1995) donde se habló de un 90 a 95% de eliminación, aunque no fueran sometidas a tratamiento, ya que aún no se ha establecido uno adecuado para la infección por VPH³⁵. Las diferencias encontradas en los porcentajes de eliminación entre los diferentes estudios llevados a cabo a nivel mundial han sido atribuidas principalmente a los diferentes métodos de detección utilizadas³³, ya que diferentes métodos para la detección del VPH se han utilizado en los estudios realizados, otro factor para estas diferencias es la población estudiada, ya que las características étnicas, así como los factores ambientales influyen en la facilidad de eliminación de esta infección.

No se han encontrado reportes sobre la dificultad para eliminar algunos tipos de VPH con respecto a otros tipos. En este trabajo se encontró que algunos VPH son más difíciles de eliminar que otros, ya que al comparar los resultados de prevalencia obtenidos durante el 2002 contra los del 2005, se observó que la mayoría de casos del 2002 para ciertos tipos de VPH aun permanecían en el 2005, mientras que en otros tipos la mayoría de los casos eran eliminados. En el caso del VPH tipo 81 se encontró que de los 3 casos encontrados en el 2002, sólo una paciente logró eliminar la infección con este tipo y las otras dos pacientes permanecieron con la infección por tres años (66%). Caso contrario ocurrió con el VPH tipo 59 presente en los casos del 2002 ($n=29$). El 3% ($n=1$) de estos permaneció con la infección y el 97% ($n=28$) restante la eliminó por lo que estos datos dan un indicio de que algunos tipo de VPH son más fáciles de eliminar que otros. Sin embargo, no se puede concluir firmemente ya que mas análisis con mayor numero de muestras seria recomendable para poder equiparar estos resultados.

Ho y cols.²³ (1998) encontraron que la edad de las mujeres es un factor para la persistencia de la infección, ya que mujeres mayores de 45 años tienen mayor dificultad para eliminar la infección por el VPH en comparación con mujeres jóvenes, dado que la respuesta inmune difiere entre ambos grupos. Además, encontraron que la presencia de múltiples infecciones con el VPH aumenta la dificultad de eliminarlas. En el presente trabajo se encontró que factores como la edad de inicio de vida sexual, la edad del primer embarazo, la aparición de infecciones múltiples así como el consumo de vitamínicos y el presentar un estado civil diferente al de casado representan un riesgo para la eliminación de la infección, es decir que

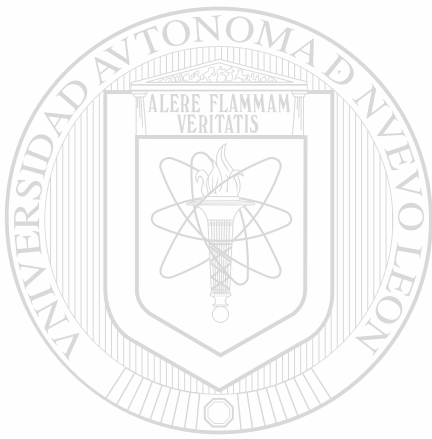
“Seguimiento a tres años de mujeres asintomáticas portadoras del virus del papiloma humano”

estas variables tiene una influencia positiva sobre la presencia de la infección con el VPH y su persistencia por mayor tiempo, lo que a futuro ocasiona la aparición de lesiones intraepiteliales cervicales. Contrario a lo encontrado por Ho y cols. (1998) en el presente estudio se observó que la presencia de VPH de bajo riesgo aumenta la probabilidad de persistencia de la infección. En el mismo contexto este autor observó un efecto protector del tabaquismo en la persistencia de la infección. Contrario es esto último, los datos de esta investigación no arrojaron relación alguna entre el tabaquismo y la persistencia del VPH estadísticamente significativa.

Bulkmans y cols.²¹ (2005) a través de un estudio de seguimiento a través de tres años de 3170 mujeres, mostraron que la aparición de lesiones es debida a las infecciones persistentes con VPH de alto riesgo. Por otra parte, en nuestra investigación previa se encontró que las mujeres con infección persistente presentan mayor número de casos con lesiones (42.9 %), en comparación con el grupo que elimina la infección (6.9%). Las lesiones que aparecieron en este grupo eran debidas a uno o más VPH de alto riesgo oncogénico, mientras que los casos que no desarrollaron lesiones en su mayoría eran infecciones persistentes con VPH de bajo riesgo, lo que explica la ausencia de lesiones aún cuando la infección no ha sido eliminada y que esta permanezca en el organismo por mucho tiempo, como fue encontrado de igual modo por Franco y cols³⁶. (1999). Resulta interesante el hecho de que la aparición de infecciones con VPH de alto riesgo que han permanecido por tres años en el organismo huésped no han logrado causar lesiones en el epitelio cervical, lo cual posiblemente se deba a que se trata de infecciones con el mismo tipo de VPH pero con alguna variante diferente a la encontrada durante el 2002. Otra

“Seguimiento a tres años de mujeres asintomáticas portadoras del virus del papiloma humano”

posible explicación es que esto se deba a algún factor epidemiológico o genético protector que esta causando que el VPH no pueda causar ninguna lesión aún cuando este se encuentre presente por mucho tiempo^{15, 8, 18}. Ambas hipótesis deberán corroborarse antes de afirmar alguna de ellas como consecuencia de lo observado en este estudio.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que se llegan a través de los resultados obtenidos en este trabajo son las siguientes:

- © La infección con el VPH es transitoria en la mayoría de los casos y solo en una pequeña proporción ésta no se resuelve y llega a producir un cáncer cervico uterino.
- © Las lesiones que son producidas por VPH, son producidas por los tipos de alto riesgo oncogénico, pero además estas infecciones deben ser persistentes, ya que las transitorias no producen lesiones graves.
- © Las infecciones con algunos tipos de VPH de alto riesgo oncogénico son más susceptibles a ser eliminadas que las provocadas por los virus de bajo riesgo.
- © Los siguientes factores epidemiológicos de la población femenina son riesgo de infección persistente por VPH en la población del Monterrey y su área metropolitana:

- ✓ Edad de inicio de vida sexual de la mujer
- ✓ Edad del primer embarazo
- ✓ Infecciones con VPH de bajo riesgo
- ✓ Infecciones con más de un tipo de VPH
- ✓ Consumo de suplementos vitamínico por desnutrición
- ✓ Estado civil diferente al de casada

BIBLIOGRAFIA

- 1) **Burd Eileen M (2003) "Human Papillomavirus And Cervical Cancer" CMR; 16: 1-17**
 - 2) **Peitsaro Panu, Bo Johansson And Stina Syrjänen (2002) "Integrated Human Papillomavirus Type 16 Is Frequently Found In Cervical Cancer Precursors As Demonstrated By A Novel Quantitative Real-Time PCR Technique" JCM; 40: 886-891**
 - 3) **Zur Hausen Harald (2002) "Papillomaviruses And Cancer: From Basic Studies To Clinical Application" Nature; 2: 342-350**
 - 4) **Calleja-Macias Itzel E, Mina Kalantari, John Huh, Rocio Ortiz-Lopez, Augusto Rojas-Martinez, Juan F Gonzalez-Guerrero, Anna-Lise Williamson, Bjo" Rn Hagmar, Dorothy J Wiley, Luis Villarreal, Hans-Ulrich Bernard And Hugo A Barrera-Saldaña (2004) "Genomic Diversity Of Human Papillomavirus-16, 18, 31, And 35 Isolates In A Mexican Population And Relationship To European, African, And Native American Variants" Virology; 319: 315- 323**
 - 5) **Muñoz Nubia, F Xavier Bosch (1997) "Cervical Cancer And Human Papillomavirus: Epidemiological Evidence And Perspectives For Prevention" Salud Publica de México; 39: 274-282**
-
- 6) **www.familydoctor.org/e138.xml**
 - 7) **Franco Eduardo L, Eliane Duarte-Franco, Alex Ferenczy (2001) "Cervical Cancer: Epidemiology, Prevention And The Role Of Human Papillomavirus Infection" CMAJ; 164: 1017-1025**
 - 8) **Sierra-Torres Carlos H, William W Au, Concepcion D Arrastia, Nohelia Cajas-Salazar, Sonia C Robazetti, Deborah A Payne, Stephen K Tying (2003) "Polymorphisms For Chemical Metabolizing Genes And Risk For Cervical Neoplasia" Environmental And Molecular Mutagenesis; 4: 69-76**
 - 9) **Terry G, L Ho, P Londesborough, P Cross, A Lopes, J Monaghan And J Cuzick (2004) "The Role Of Human Papillomavirus Type 16 And The Fragile Histidine Triad Gene In The Outcome Of Cervical Neoplastic Lesions" British Journal Of Cancer; 91: 2056-2062**
 - 10) **www.salud.gob.mx**

“Seguimiento a tres años de mujeres asintomáticas portadoras del virus del papiloma humano”

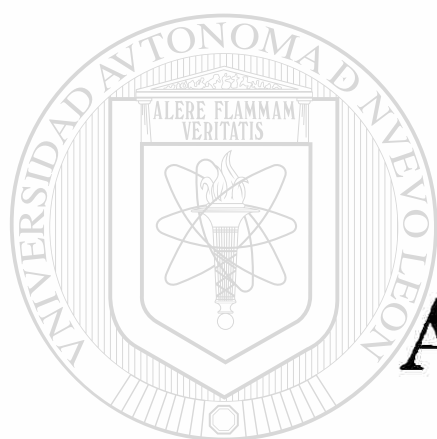
- 11) **Sellers John W, Tina L Karwalajtys, Janusz Kaczorowski, James B Mahony, Alice Lytwyn, Sylvia Chong, Joanna Sparrow, Attila Lorincz, (2003) “Incidence, Clearance And Predictors Of Human Papillomavirus Infection In Women “ CMAJ; 168: 421-425**
 - 12) **Hildesheim Allan, Sophia S Wang (2002) “Host And Viral Genetics And Risk Of Cervical Cancer: A Review” Virus Research; 89: 229-240**
 - 13) **Branca M, A Garbuglia, A Benedetto, T Cappiello, L Leoncini, G Migliore, A Agarossi, K Syrjänen (2003) “Factors predicting the persistence of genital human papillomavirus infections and PAP smear abnormality in HIV-positive and HIV-negative women during prospective follow-up” International Journal of STD and AIDS; 14: 417-425**
 - 14) **Cervantes Jorge (2003) “Aspectos Inmunológicos De La Infección Por Papilomavirus Humano Rol Del Complejo Mayor De Histocompatibilidad” Rev Med Hered; 14: 94-98**
 - 15) **Lin Patricia, Laura A Koutsky, Cathy W Critchlow, Raymond J Apple, Stephen E Hawes, James P Hughes, Papa Toure', Amadou Dembele, And Nancy B Kiviat (2001) “HLA Class II DR-DQ And Increased Risk Of Cervical Cancer Among Senegalese Women” Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention; 10: 1037-1045**
 - 16) **Sanclemente Gloria (2003) “Lo Que Los Clínicos Deben Saber Acerca De Las Vacunas Contra El Virus Del Papiloma Humano” Gac Méd Méx; 139: 173-183**
-
- 17) **Mitsubishi Akira, Kiyomi Suzuka, Koji Yamazawa, Hideo Matsui, Katsuyoshi Seki And Souei Sekiya (2005) “Serum Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) And VEGF-C Levels As Tumor Markers In Patients With Cervical Carcinoma” Cancer; 103: 724-730**
 - 18) **Tommasino Massimo, N Rosita Accardi, Sandra Caldeira, Wen Dong, Ilaria Malanchi, Anouk Smet And Ingeborg Zehbe (2003) “The Role Of Tp53 In Cervical Carcinogenesis” Human Mutation; 21: 307-312**
 - 19) **Volgareva Galina, Larisa Zavalishina, Yulia Andreeva, Georgy Frank, Ella Krutikova, Darya Golovina, Alexander Bliev, Dimitry Spitkovsky, Valeriya Ermilova And Fjodor Kissel'ov (2004) “Protein p16 As A Marker Of Dysplastic And Neoplastic Alterations In Cervical Epithelial Cells” BMC Cancer; 4: 58-68**
 - 20) **Wu Ming-Fang, Ya-Wen Cheng, Ji-Ching Lai, Min-Chih Hsu, Jung-Ta Chen, Wen-Shan Liu, Ming-Chih Chiou, Chih-Yi Chen And Huei Lee (2005) “Frequent P16ink4a Promoter Hypermethylation In Human Papillomavirus-Infected Female Lung Cancer In Taiwan” Int J Cancer; 113: 440-445**

“Seguimiento a tres años de mujeres asintomáticas portadoras del virus del papiloma humano”

- 21) **Bulkmans NWJ, L Rozendaal, FJ Voorhorst, PJF Snijders And CJLM Meijer, (2005) “Long-Term Protective Effect Of High-Risk Human Papillomavirus Testing In Population-Based Cervical Screening” British Journal Of Cancer; 92: 1800-1802**
- 22) **Longworth Michelle S, Regina Wilson And Laimonis A Laimins (2005) “HPV 31 E7 Facilitates Replication By Activating E2F2 Transcription Through Its Interaction With HDACS” The EMBO Journal; 24: 1821-1830**
- 23) **Ho Gloria, Robert Bierman, Leah Beardsley, Chee Chang, Robert Burk (1998) “Natural History Of Cervicovaginal Papillomavirus Infection In Young Women” NEJM; 338: 423-428**
- 24) **Nobbenhuis Mariëlle, Jan Walboomers, Chris Meijer (1999) “Relation of Human papilloma virus to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study” Lancet; 354: 20-25**
- 25) **Coutlée François, Patti Gravitt, Janet Kornegay, Catherine Hankins, Harriet Richardson, Normand Lapointe, Hélène Voyer, The Canadian Women’s HIV Study Group And Eduardo Franco (2002) “Use Of PGMY Primers In L1 Consensus PCR Improves Detection Of Human Papillomavirus DNA In Genital Samples” JCM; 40: 902-907**
- 26) **Fuessel Haws Andrea L, Qin He, Peter L Rady, Lifang Zhang, James Grady, Thomas K Hughes, Kendra Stisser, Rolf Konig, Stephen K Tyring (2004) “Nested PCR With The PGMY 09/11 And GP5+/6+ Primer Sets Improves Detection Of HPV DNA In Cervical Samples” Journal Of Virological Methods; 122: 87-93**
- 27) **Giovannelli Lucia, Anna Lama, Giuseppina Capra, Viviana Giordano, Pietro Arico And Pietro Ammatunai (2004) “Detection Of Human Papillomavirus DNA In Cervical Samples: Analysis Of The New PGMY-PCR Compared To The Hybrid Capture II And MY-PCR Assays And A Two-Step Nested PCR Assay” JCM; 42: 3861-3864**
- 28) **Gravitt P E, C L Peyton, R J Apple And C M Wheeler (1998) “Genotyping Of 27 Human Papillomavirus Types By Using L1 Consensus PCR Products By A Single-Hybridization, Reverse Line Blot Detection Method” Journal Of Clinical Microbiology; 36: 3020-3027**
- 29) **Gravitt P E, C L Peyton, T Q Alessi, C M Wheeler, F Coutle’E, A Hildesheim, M H Schiffman, D R Scott, And R J Apple (2000) “Improved Amplification Of Genital Human Papillomaviruses” Journal Of Clinical Microbiology; 38: 3028-3040**

“Seguimiento a tres años de mujeres asintomáticas portadoras del virus del papiloma humano”

- 30) **Giuliano Anna, Harris R, Sedjo R, Baldwin S, Denise R, Papenfuss M, Hatch K (2002) “Incidence, prevalence and clearance of type-specific Human papillomavirus infections: the young women’s health study” JID; 185: 462-469**
- 31) **Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah K, Alonso P, Hernandez P, Salmero J, Hernandez M (2001) “Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology” Int J Cancer; 91: 412-420**
- 32) **Gonzalez-Losa Mdel R, Rosado-Lopez I, Valdez-Gonzalez N, Puerto-Solis M. (2004) “High prevalence of human papillomavirus type 58 in Mexican colposcopy patients” J Clin Virol; 29: 202-205**
- 33) **Mosciki Anna, Shiboski S, Broering J, Powell K (1998) “The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women” The Journal of Pediatrics; 132: 277-284**
- 34) **Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wadell G (1995) “Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study” J Infect Dis; 17: 1026-30**
- 35) **Disbrow GL, Baege AC, Kierpiec KA, Yuan H, Centeno JA, Thibodeaux CA, Hartmann D, Schlegel R (2005) “Dihydroartemisinin is cytotoxic to papillomavirus-expressing epithelial cells in vitro and in vivo” Cancer Res; 23: 10854-61**
- 36) **Franco Eduardo L, Luisa L Villa, Joao P Sobrinho, Jose M Prado, Marie-Claude Rousseau, Marie Désy, Thomas E Rohan (1999) “Epidemiology Of Acquisition And Clearance Of Cervical Human Papillomavirus Infection In Women From A High- Risk Area For Cervical Cancer” JID; 180: 1415-1423**
- 37) [//susalud.50megs.com/colpos.html](http://susalud.50megs.com/colpos.html)
- 38) www.pudmed.com
- 39) [//kdcg.hallym.or.kr/immunogenetics/NEJM-HLA.htm](http://kdcg.hallym.or.kr/immunogenetics/NEJM-HLA.htm)



ANEXOS

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Anexo I: Carta de consentimiento informado.

Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Delegación Regional del Instituto Mexicano del Seguro Social en Nuevo León y Secretaria de Salud de Nuevo León.

Consentimiento Informado Para Muestra de Papanicolau
Proyecto de Investigación: Estudios Sobre el Riesgo de Progresión de Infecciones Cervico-Uterinas con el Virus del Papiloma Humano hacia Cáncer.

Estimada Paciente,

La infección del virus del papiloma humano es una infección común y silenciosa que afecta particularmente a las mujeres. Algunos tipos de este virus pueden causar cáncer de la matriz.

En esta investigación, que se realizara en la facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, queremos conocer como ha progresado la infección del virus del papiloma humano en aquellas mujeres que presentaron esta infección en el año 2002, además de estudiar algunos de los posibles factores que pudieran ayudar a la persistencia de esta infección. Para esta investigación se necesitaran muestras de sangre y muestras del examen ginecológico que se utiliza para la detección oportuna del cáncer. Si usted desea contribuir voluntariamente en esta investigación, le vamos a pedir que:

- ✓ **Conteste un cuestionario que no tendrá su nombre (anónimo).**
- ✓ **De su consentimiento para tomarle muestras de sangre y del papanicolau para nuestra investigación.**

Estoy enterada que:

- ❖ **Las muestras de sangre y papanicolau servirán para que los científicos conozcan que factores ayudan a la persistencia de la infección del virus del papiloma humano y que factores ayuden a eliminarla.**
- ❖ **Si no quiero dar una muestra para este estudio, la atención medica que recibiré no se vera afectada de ninguna manera y recibiré el trato considerado que merezco.**
- ❖ **Para garantizar mi privacidad, la muestra y el cuestionario para este estudio estarán marcados con un numero en lugar de mi nombre. Este numero será usado para identificar el reporte de mi muestra y solo será conocido por mi medico y por el laboratorio estatal de citología, perteneciente a la SSNL o por el departamento de Patología del Hospital Regional de Especialidades No 23 del IMSS, según sea el caso, donde rutinariamente se analizan mis muestras papanicolau.**

El proyecto de esta investigación ha sido aprobado por los Comités de Investigación y Ética del Hospital Universitario y Facultad de Medicina de la UANL, de la Delegación Regional del IMSS en Nuevo León y de la SSNL.

Firma o huella digital de la persona que da el consentimiento
Nombre completo. _____

Fecha

Anexo III: Cuestionario aplicado a las pacientes.

Le agradecemos que haya decidido participar en esta importante investigación acerca de la persistencia de la infección del virus del papiloma humano que se esta realizando en los servicios asistenciales de la Secretaria de Salud de Nuevo León y la Delegación Regional del Instituto Mexicano del Seguro Social en Nuevo León, en conjunto con la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Por favor llene o circule la respuesta correcta.

1. Originaria de N.L. Si. No.

2. ¿Cuanto tiempo ha vivido en el estado de Nuevo León? _____ años

3. ¿Cuál es su fecha de nacimiento? _____ / _____ / _____ Edad: _____ años
Día Mes Año

4. Nivel de estudios:

a) Primaria incompleta

b) Primaria completa

c) Secundaria- Nivel Técnico

d) Preparatoria

e) Licenciatura

f) Otro (especifique): _____

5. Estado civil:

a) Soltera

b) Casada

c) Unión libre

d) Viuda

e) Divorciada

6. ¿Con que tipo de servicio medico cuesta usted?

- a) IMSS
- b) ISSSTE
- c) Centros de salud y hospitales de la Secretaría
- d) Seguro privado
- e) Otro (especifique) _____

7. ¿Cuáles la fecha de su ultima menstruación? _____ / _____ / _____
Día Mes Año

8. Edad de la primera menstruación. _____ años

9. Edad de inicio de vida sexual. _____ años

10. ¿Esta actualmente embarazada?

- a) Si
- b) No
- c) No se

11. ¿Cuántas veces ha estado embarazada anteriormente? _____
(Si no ha estado embarazada pase a la pregunta 13)

- ¿Cuántos partos? _____
- ¿Cuántos abortos? _____
- ¿Cuántas cesáreas? _____
- ¿Cuántos hijos vivos? _____

12. ¿Cuántos años tenia cuando tuvo su primer embarazo? _____ años

13. ¿Alguna vez le han hecho el examen de cáncer de matriz o Papanicolau?

- a) Si
- b) No (Pase a la pregunta 20)

14. Aproximadamente, ¿Cuántos exámenes de cáncer de la matriz o Papanicolau le han hecho en los últimos 5 años? _____

15. Fecha del ultimo Papanicolau? _____ / _____
Mes Año

16. Institución que se lo practico (PAP)

- a) IMSS
- b) ISSSTE
- c) Centros de salud y hospitales de la Secretaria de Salud
- d) Seguro privado
- e) Otro (especifique) _____

17. ¿Cuál fue el resultado de su examen de Papanicolau mas reciente?

- a) Normal
- b) Anormal (si recuerda el diagnostico exacto, por favor especifiquelo)

- c) No supe el resultado

18. Recibió tratamiento (Circule todas las que se apliquen)

- a) No recibí
- b) Criocirugía (quemar)
- c) Cauterización (congelar)
- d) Láser

19. Si usted tuvo cáncer de matriz

Marque el tratamiento que recibió (Marque una o varias)

- a) Biopsia
- b) Cirugía
- c) Radioterapia
- d) Quimioterapia
- e) Otra (especifique por favor) _____
- f) No sé

¿Dónde recibió tratamiento para este cáncer? (especifique el nombre y la localización de la institución)

Nombre:

Dirección:

¿Edad que tenía usted cuando le diagnosticaron el cáncer? ____/____ años

20. ¿Toma usted algún suplemento vitamínico?

Si. _____ No.

Especifique: _____

21. ¿Sabe si en este suplemento esta incluida la vitamina B9 o ácido fólico?

Si. _____ No.

22. ¿Fuma?

Si. _____ No.

a) 1 – 10 / día

b) 10 – 20 / día

c) 20 / día

23. Numero de compañeros sexuales que ha tenido. _____

24. Su(s) compañero(s) sexual(es) tiene circuncisión. _____

25. ¿Usa algún método anticonceptivo?

a) Si

b) No (vaya a pregunta 25)

26. ¿Cuál es el principal método anticonceptivo que usa?

- a) Inyecciones para el control de natalidad
- b) Dispositivo intrauterino (DIU)
- c) Píldoras/anticonceptivos orales
- d) Condones
- e) Espermicidas o espuma
- f) Diafragma
- g) Vasectomía en su pareja
- h) Método del ritmo
- i) Ligaduras de trompas (salpingoclasia)
- j) Otros (especifique) _____

27. Tiene usted:

✓ Diabetes (Edad en que se la diagnosticaron) _____ años.

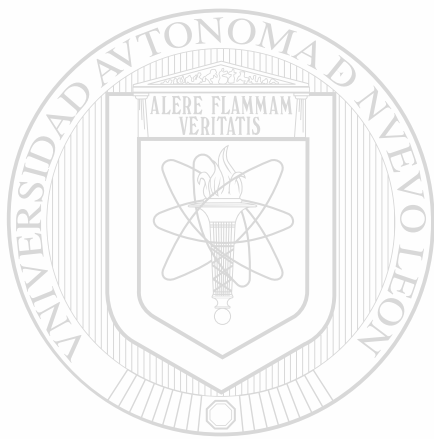
✓ Ha tenido flujo vaginal o desecho vaginal. Si. No.

✓ Enfermedades venéreas. Si. No.
(Especifique)

DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS

POR FAVOR, REVISE QUE NO HAYA QUEDADO NINGUNA PREGUNTA SIN CONTESTAR

!!!MUCHAS GRACIAS POR PARTICIPAR EN NUESTRA INVESTIGACION!!!



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Blank white label on a dark textured background.