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 hacia introducir el cepillo al inicio del canal cervical. Una vez dentro, éste se hacia 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
Precervcyt	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

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

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	Eppendor, Hamburgo, Alemania
Termociclador PTC-100	MJ Research, NJ EUA

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 el 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

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 µl 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 µl 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 observa 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 µl 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 correspondia al tipo de VPH amplificado de la muestra tomada.

4.4.5 Hibridación con sondas específicas para detección y tipificación de VPH

A 50 µL de producto amplificado se le añadió 50 µL de solución desnaturalizante y se incubo 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 agrego 100uL de la mezcla de producto amplificado-solución desnaturalizante para incubar todo a 53°C por 30min en baño de agua. Se elimino 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 incubo 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 elimino 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 realizo 1 lavado rápido y posteriormente se agregaron 3ml de solución de lavado, esto se puso en agitación a temperatura ambiente durante 10min. Posteriormente se aspiro 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 dejo 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 elimino la solución de citratos por

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

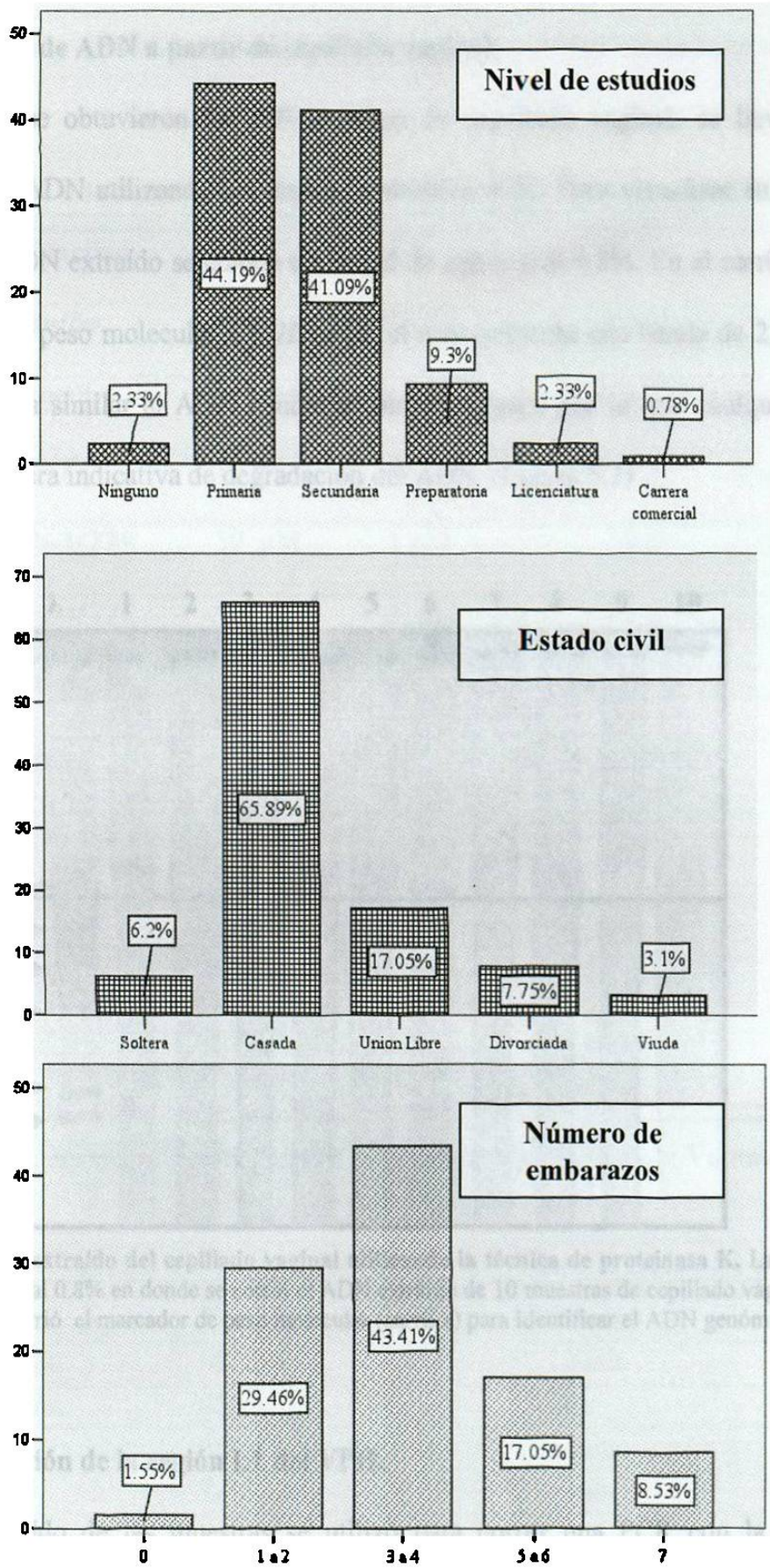
El análisis estadístico fue realizado usando el paquete computacional SPSS® (versión 13 para Windows). Para encontrar alguna relación tanto entre las variables nominales como ordinales y la persistencia de la infección con el VPH se elaboraron tablas de contingencia y se analizaron usando la Prueba de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

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 ± 10, con una menarquia a los 12 años ±1.7, un inicio de vida sexual a los 18 años ±3 y una edad de 20 años ±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.



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 λ + *Hin*d 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)

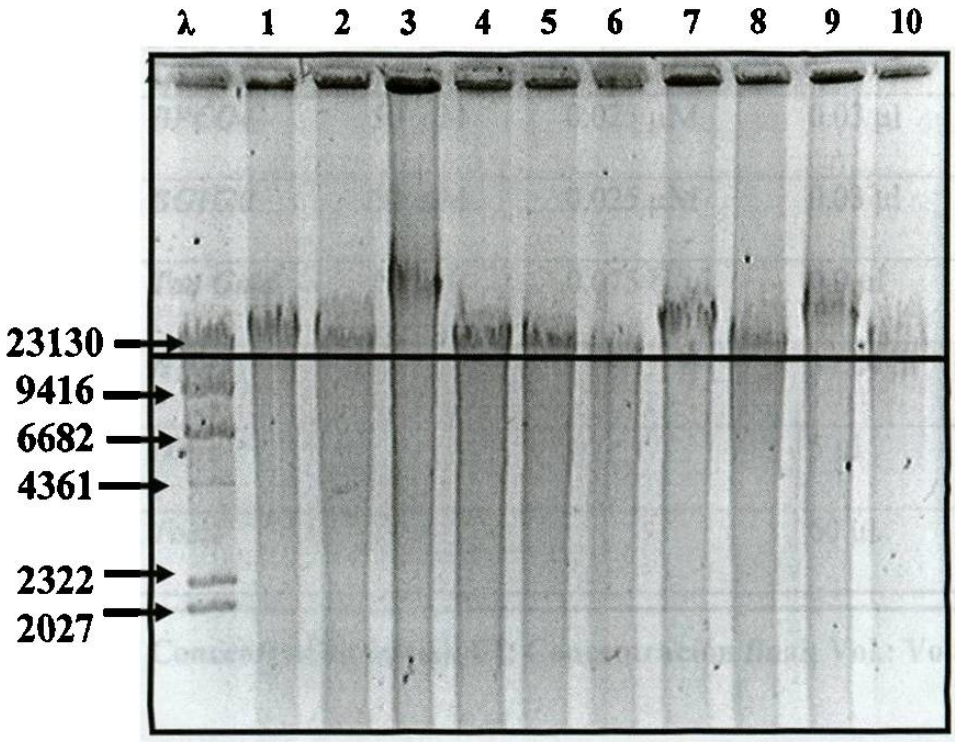


Figura 5.2 ADN extraído del cepillado vaginal utilizando la técnica de proteinasa K. La figura muestra un gel de agarosa al 0.8% en donde se corrió el ADN extraído de 10 muestras de cepillado vaginal (carriles 2-11), además se corrió el marcador de peso molecular (carril 1) para identificar el ADN genómico.

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

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.
Buffer	10X	1X	6.0 µl
$MgCl_2$	25 mM	4 mM	9.6 µl
dNTPs	10 mM	0.4 mM	1.2 µl
PGMY09	50 µM	1 µM	1.2 µl
PGMY11	50 µM	1 µM	1.2 µl
BPCO4	50 µM	0.025 µM	0.03 µl
BGH20	50 µM	0.025 µM	0.03 µl
Taq Gold	5 U/µl	0.075 U/µl	0.9 µl
H_2O			34.84 µl
DNA			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 λ + *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.

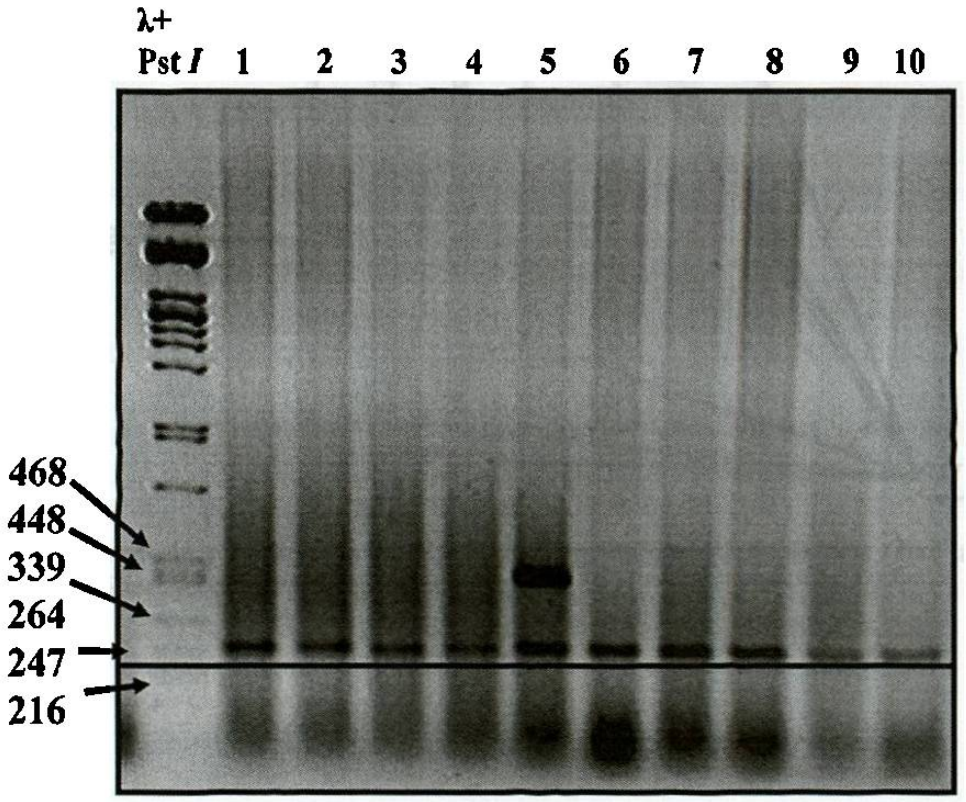


Figura 5.3 Resultado de la amplificación de la región L1 del VPH. La figura exhibe 10 muestras de diferentes pacientes sometidas a la amplificación del gen L1, la muestra del carril numero 5 es positiva la presencia del VPH en la muestra colectada.

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.

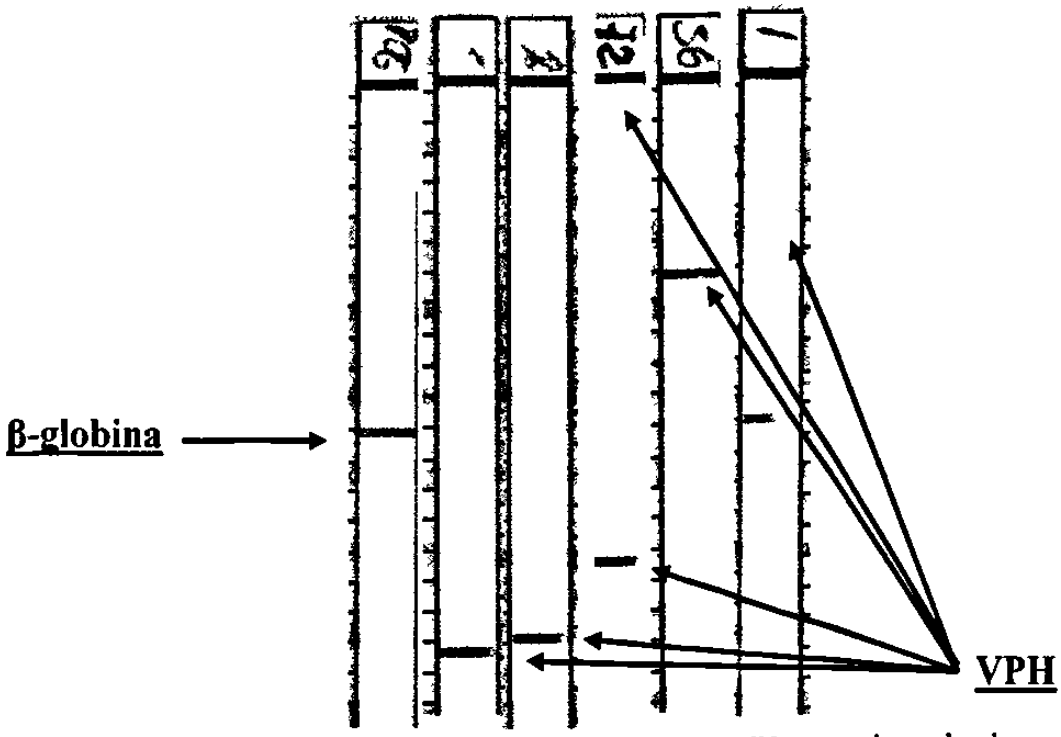


Figura 5.4 Detección y tipificación del VPH. La figura muestra diferentes tiras sobre las que se revela la presencia y tipificación del VPH detectado por PCR

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 séle encontró en el 1er 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 la infecciones con el VPH tipo 52 (2do lugar de prevalencia en el 2002) fueron eliminadas, no encontrándose casos con este tipo de virus en el 2005. (Figura 5.5).

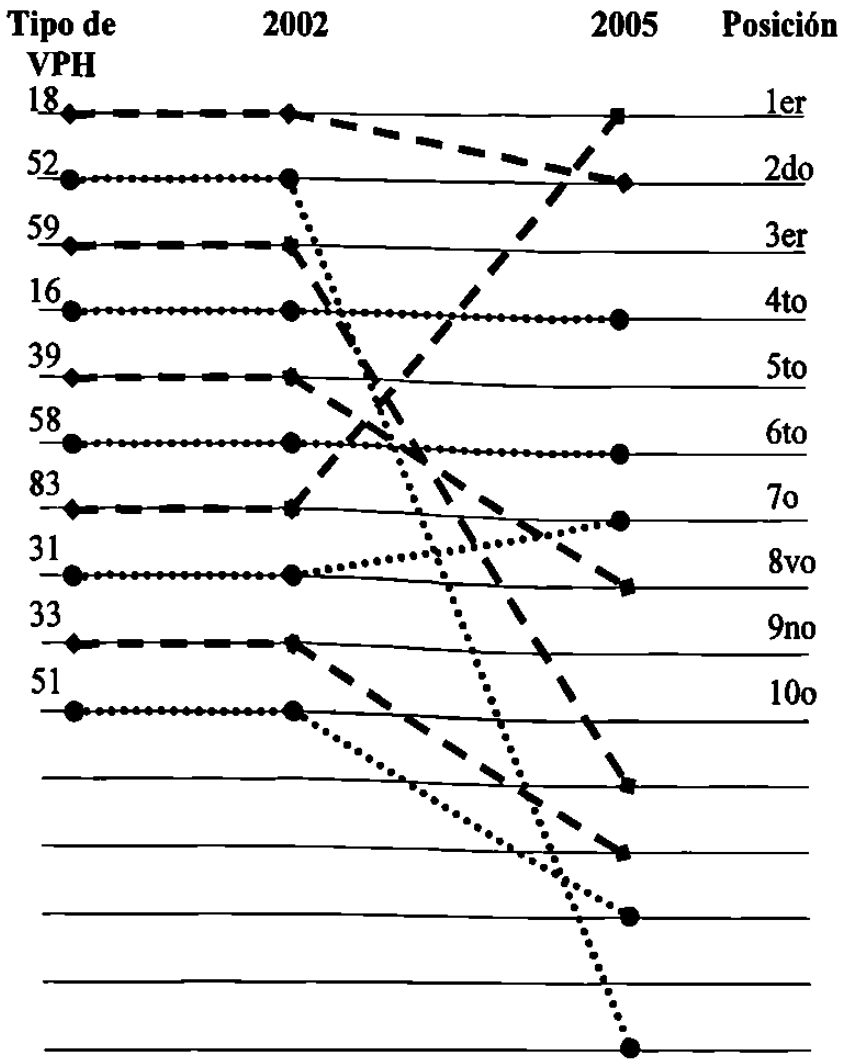


Figura 5.5 Comparativa de la prevalencia del VPH detectada tras las tipificaciones del 2002 y 2005. La figura muestra los cambios de posición en las prevalencias de los tamizajes realizados en estas dos etapas de la investigación.

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

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

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 significancía 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 significancía 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 trabajó 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).

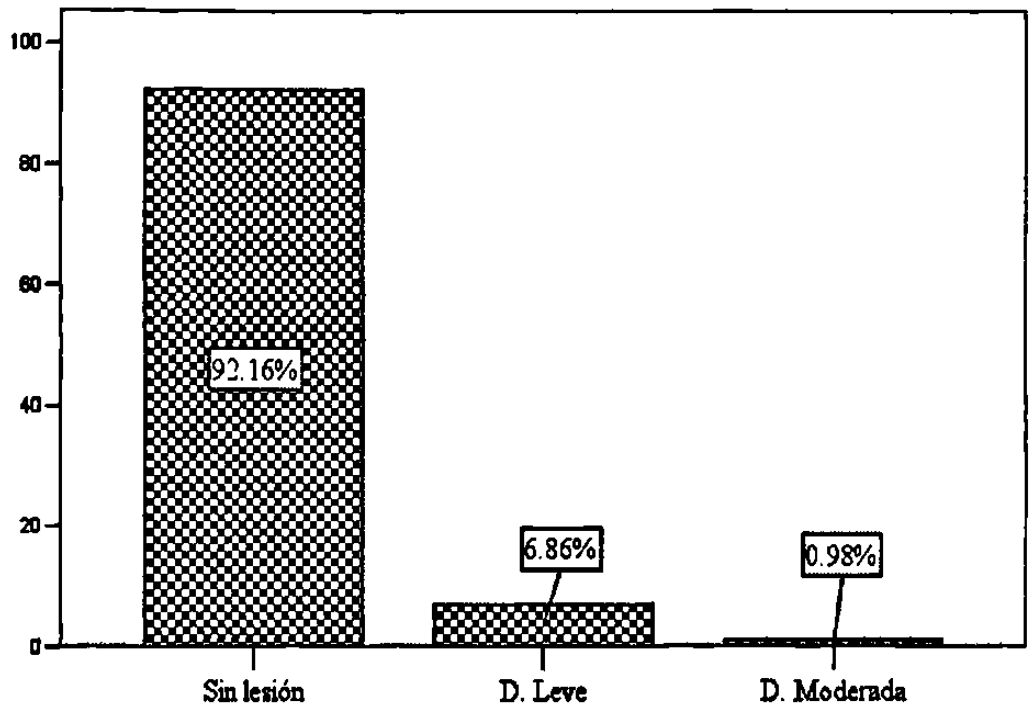


Figura 5.6Grupo de mujeres que eliminaron la infección.

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

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).

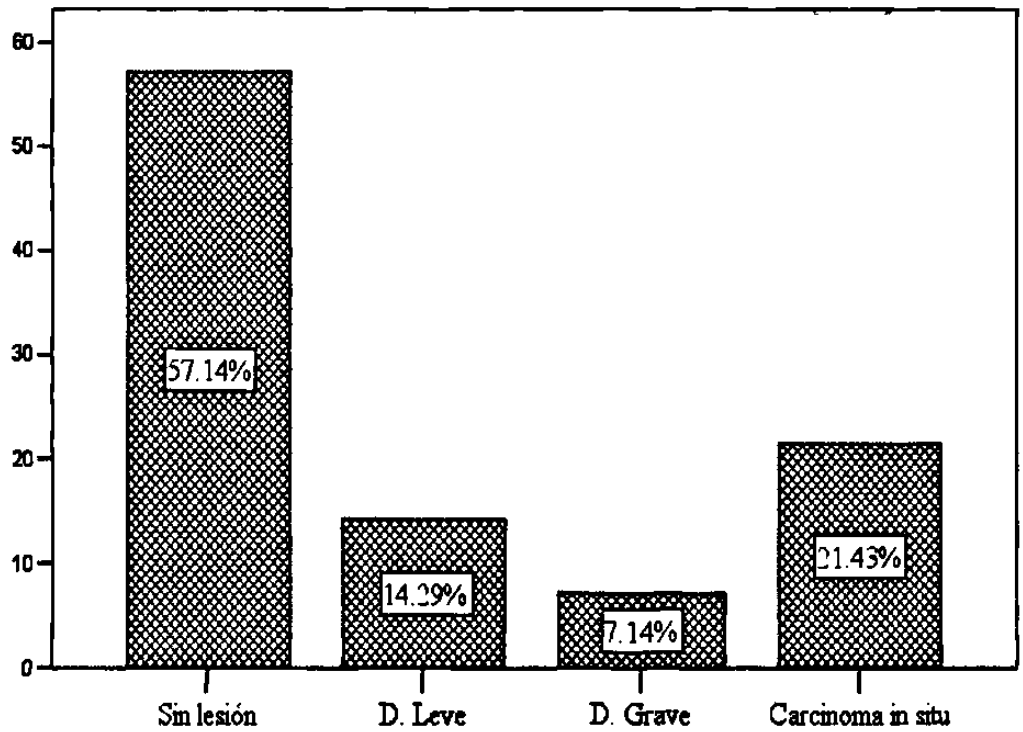


Figura 5.7 Grupo de mujeres con infección persistente.

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 80s[3]. 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 dónde 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

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 VPH[35]. 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 utilizadas[33], 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

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 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 cols[36]. (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

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.

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 Tyring (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

11) **Sellors 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) **Mitsuhashi 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 Kisseljov (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

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 Ammatunal (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

30) **Giuliano Anna**, Harris R, Sedjo R, Baldwin S, Denise R, Papenfuss M, Hatch K (2002) **"Incidence, prevalence and clearence of type.specific Human papillomavirus infectios: the young women's health study"** JID; 185: 462-469

31) **Lazcano-Ponce E**, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah K, Alonso P, Hernanadez 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

38) www.pudmed.com

39) //kdcp.hallym.or.kr/immunogenetics/NEJM-HLA.htm

ANEXOS

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 Fecha

Nombre completo. _____

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 Secr...
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?_____
¿Cuantos 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 especifíquelo)
_____
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 acido 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)

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

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

TIPO DE ADQUISICION
DONATIVO