



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

T E S I S:

**“Genotipificación del Virus de Papiloma Humano (VPH) en
Mujeres Embarazadas e Infechadas del Instituto Nacional de
Perinatología”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

Presenta:

Q.B.P. CARMEN SELENE GARCÍA ROMERO

Directores de Tesis:

**Dr. en C. Ramón Mauricio Coral Vázquez
M. en C. Saúl Flores Medina**



México, D.F., Abril de 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 8:00 horas del día 20 del mes de Mayo del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESM para examinar la tesis titulada:

“Genotipificación del Virus de Papiloma Humano (VPH) en Mujeres Embarazadas e Infectadas del Instituto Nacional de Perinatología”

Presentada por el alumno:

García	Romero	Carmen Selene
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	8	9	4
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias de la Salud

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Ramón Maurício Coral Vázquez

M. en C. Saúl Flores Medina

Dr. José Alfredo Sierra Ramírez

CALZADA MENDOZA
CLAUDIA CAMELIA
Dra. Claudia Camelia Calzada
Mendoza

M. en C. Diana Mercedes Sorjano
Becerril

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Eleazar Lara Padilla



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
I.P.N.
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION
CONTROL ESCOLAR



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 20 del mes mayo del año 2011, la que suscribe García Romero Carmen Selene alumno del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud con número de registro B091894 adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez, M. en C. Saúl Flores Medina y cede los derechos del trabajo intitulado “Genotipificación del Virus de Papiloma Humano (VPH) en Mujeres Embarazadas e Infectadas del Instituto Nacional de Perinatología” al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección selun_gem@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Carmen Selene García Romero

Nombre y firma

Este trabajo fué realizado en el Laboratorio de Biología Molecular y Virología del Departamento de Insectología e Inmunología Perinatal del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”, de la Secretaria de Salud.

Contenido

RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1.INTRODUCCIÓN	12
2.MARCO TEÓRICO	13
2.1.1. GENERALIDADES DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) ...	13
2.1.2. EPIDEMIOLOGIA	16
2.1.3. PATOGENIA.....	21
2.1.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	24
2.1.5. Cáncer y VPH.....	26
2.1.6. VPH EN EL EMBARAZO.....	31
2.1.7. DIAGNOSTICO DEL VPH.....	35
3. JUSTIFICACIÓN	38
4. HIPÓTESIS	41
5. OBJETIVOS	41
5.1. OBJETIVO GENERAL	41
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES	41
6. MATERIAL Y MÉTODOS	42
6.1. TIPO DE ESTUDIO	42
6.2. UNIVERSO DE ESTUDIO	42
6.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA	42
6.3.1. INCLUSIÓN	42
6.3.2. NO INCLUSIÓN	42
6.3.3. EXCLUSIÓN.....	43
6.3.4. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN	43
6.4. TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	43
6.5. VARIABLES	43
6.6. METODOLOGÍA.	44
6.6.1 TOMA DE MUESTRA.....	44
6.6.2 EXTRACCIÓN DE DNA.....	44
6.6.3 AMPLIFICACIÓN UNIVERSAL DE DNA VIRAL EMPLEANDO	45
INICIADORES CONSENSO L1.	45
6.6.4 GENOTIPIFICACIÓN DE VPH.....	46
A) Extracción de ADN	46
B) Amplificación del DNA blanco mediante PCR.	47

C) Hibridación de los productos amplificados.....	48
6.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	50
7. RESULTADOS.....	51
8. DISCUSION.....	65
9.CONCLUSIONES.....	69
10. PERSPECTIVAS.....	70
12. ANEXOS.....	71
A) CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	71
B) CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN PARA PCR.....	73
C) SECUENCIAS DE INICIADORES EMPLEADOS PARA LA DETECCIÓN DEL DNA DE VPH.....	73
11. BIBLIOGRAFÍA.....	76

ABREVIATURAS

μL	Microlitros
μM	Micromol
All	Alteraciones Inflamatorias Inespecíficas
ANT G.O	Antecedentes Gineco-Obstetricos
ARI	Abundante Reacción Inflamatoria
ATCA	Acido Tricloro Acético
CM	Células de Metaplasia
DNA	Acido desoxirribonucleico
Ep.Vag	Epitelio Vaginal
ERI	Escasa Reacción Inflamatoria
IVSA	Inicio de Vida Sexual Activa
LIEBG	Lesión intraepitelial de Bajo Grado
LIEBG	Lesión Intraepitelial de Bajo Grado
mL	Mililitros
mM	Milimol
MMX	Mezcla Maestra
MRI	Moderada Reacción Inflamatoria
NCM	Negativo a Células Malignas
ng	Nano gramos
NIC	Neoplasia Intracelular
nm	Nanomol
pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del ingles <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PS	Parejas Sexuales
rpm	Revoluciones por minuto
SDG	Semanas de Gestación
SHA-RP	Streptavidina y peroxidasa de rábano picante
TMB	Tetrametilbencidina
VPH	Virus de Papiloma Humano

ÍNDICE DE FIGURAS

	PAGINA
FIGURA 1. Imagen que muestra la banda de β -globina y la posición de los Controles Negativo (CN) Y Positivo (CP).	45
FIGURA 2. Imagen que muestra el patrón de lectura para correlacionar las muestras problema.	46
FIGURA 3. Imagen que muestra las bandas de identificación de genotipos y su comparación con el patrón de lectura para asignar al genotipo de VPH presente.	46
FIGURA 4. Distribución de los genotipos detectados en 37 pacientes infectadas por VPH	47
FIGURA 5. Genotipos identificados en 24 pacientes con VPH	52
FIGURA 6. Clasificación de las pacientes de acuerdo al trimestre del embarazo en el cual se encontraban al momento del diagnóstico de la infección por VPH.	52
FIGURA 7. Condición fisiológica de las 37 pacientes obstétricas incluidas en el estudio.	53
FIGURA 8. Distribución en grupos de edad de las 37 pacientes incluidas en el estudio.	54
FIGURA 9. Edad de inicio de vida sexual, en las 37 pacientes incluidas en el estudio.	54
FIGURA 10. Número de parejas sexuales manifestado por las 37 pacientes con infección por VPH.	55
FIGURA 11. Distribución de los aislamientos de 37 cervicovaginales obtenidos de las pacientes estudiadas con infección por VPH.	56
FIGURA 12. Distribución de infecciones de transmisión sexual detectadas en 21 pacientes con VPH	57
FIGURA 13. Localización de las lesiones detectadas en las pacientes incluidas en el estudio	57
FIGURA 14. Distribución del tipo de lesión presente en las 37 pacientes estudiadas.	58
FIGURA 15. Interpretación citológica de las muestras de 37 pacientes con infección por VPH	58

ÍNDICE DE TABLAS

	PAGINA
TABLA 1. Asociación entre genotipo aislado y lesión observada.	9
TABLA 2. Condiciones de amplificación para los tres juegos de iniciadores.	61
TABLA 3. Iniciadores empleados para la detección del DNA de VPH	61
TABLA 4. Genotipos de VPH identificados con el kit Linear Array HPV Genotyping test (Roche).	44
TABLA 5. Factores de riesgo asociados a la infección por VPH en las 37 pacientes incluidas en el estudio	62,63
TABLA 6. Cuadro de factores de riesgo asociados a la infección por VPH en 24 pacientes con Identificación de genotipos	48
TABLA 7. Cuadro de factores de riesgo asociados a la infección por VPH en 13 pacientes con Infección y sin Identificación de genotipos	49
TABLA 8. Descripción de lesión y genotipos encontrados en 15 pacientes con infección por genotipos de bajo riesgo (BR)	50
TABLA 9. Descripción de lesión y genotipos encontrados en 7 pacientes con infección mixta	50
TABLA 10. Descripción de lesión y genotipos encontrados en 2 pacientes con infección por genotipos de alto riesgo (AR)	51

RESUMEN.

La población de mujeres embarazadas infectadas por el Virus del Papiloma Humano es amplia, algunas de ellas presentan condiciones médicas que podrían influir en el curso de la enfermedad ocasionada por el virus, así como potenciar también la posibilidad de transmisión vertical, por esta razón el objetivo de este estudio fue identificar diferentes genotipos del virus del papiloma humano que se manifiestan en mayor frecuencia durante el periodo gestacional.

La detección del virus se realizó a partir de muestras de raspado cervical, la extracción de el material genético por la técnica de fenol cloroformo. El ADN obtenido se amplificó con iniciadores universales (MY09/ MY11 y GP5+/GP6+) de la región L1 del genoma del virus del papiloma humano. Las muestras positivas se genotipificaron empleando una técnica que permite detectar 37 genotipos diferentes, incluyendo 13 de alto riesgo.

Se incluyó un grupo de 37 mujeres embarazadas en las cuales el genotipo más frecuente fue el 6 (28%), identificado en 12 pacientes, predominando en las lesiones de tipo condilomatosis vulvar y anal, así como el Lesiones Intraepiteliales de Bajo Grado; en algunas pacientes el asilamiento fue único y en otras estuvo en conjunto con genotipo de Bajo Riesgo y Alto Riesgo. En 13 muestras no se logró identificación de genotipo viral por esta técnica.

ABSTRACT

The population of pregnant women infected by the Virus of the Human Papilloma is ample, some of them present/display medical conditions that could influence during the disease caused by the virus, as well as to also harness the possibility of vertical transmission, the objective of this study therefore was to identify different genotypes from the virus of the human papilloma that are pronounced in greater frequency during the gestacional period.

The detection of the virus I am realised from samples of scraped cervical, the extraction of the genetic matter by the phenol technique chloroform. The obtained DNA I amplify myself with universal initiators (MY09/MY11 and GP5+/GP6+) of the L1 region of the genome of the virus of the human papilloma. The positive samples were genotipificaron using a technique that allows to detect 37 different genotypes, including 13 of high risk.

I include a group of 37 embarrassed women in who the most frequent genotype was the 6 (28%), identified in 12 patients, predominating in the injuries of type condilomatosis to vulvar and anal, as well as Lesiones Intraepiteliales of Low Degree; in some patients the asilamiento was unique and in others it was altogether with genotype of Low Risk and Stop Risk. In 13 samples not profit identification of viral genotype by this technique.

1. INTRODUCCIÓN.

El embarazo no está exento de lesiones malignas o premalignas del cuello del útero; por ello debe practicarse una citología como parte del control prenatal. La citología cervical (Papanicolaou) sigue siendo el método universal empleado para identificar alteraciones celulares que indiquen el probable desarrollo de cáncer cervical. No hay contraindicación alguna para realizar una o más citologías durante el embarazo y el procedimiento no afecta al feto ni genera parto prematuro.

La infección por el Virus de Papiloma Humano (VPH) no afecta al feto, ni la normal evolución de un embarazo si este es bien controlado, para lo cual es sumamente importante la identificación del genotipo presente, ya que este podría proporcionar información importante que permita saber la forma ideal de manejar una paciente con esta infección y ayudar a llevar a buen término su embarazo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1.1. GENERALIDADES DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

La familia de los papilomavirus está conformada por virus que presentan DNA en su genoma, tienen afinidad por células epiteliales, y son especie-específicos. Inducen lesiones benignas, pre malignas y malignas en regiones del tracto respiratorio alto, conjuntiva y en la región ano genital. El tamaño del virus es de 55 nm de diámetro, está cubierto por una cápside que contiene DNA genómico circular de doble cadena, su genoma tiene un tamaño de 6,800-8,400 pares de bases ^{1, 2, 3} y se encuentra dividido en varias regiones: a) la región E (expresión temprana) en la que destacan las proteínas E1 que intervienen en la replicación viral; E2 que es un modulador de la transcripción viral, E4 que también parece desempeñar un papel en la replicación viral. Otras proteínas son E5, E6 y E7 que tienen un importante papel en los mecanismos de transformación celular, que explican en parte la intervención de los VPH en el proceso de oncogénesis.⁴; b) la región L (expresión tardía) con los genes implicados en la producción de la cápside viral. Las regiones tardías L están formadas por 2 secuencias L1 y L2, las cuales son responsables de la codificación de las proteínas de la cápside en la fase final de ensamblaje viral, la L1 codifica para la proteína principal de la cápside y la L2 para proteínas secundarias antígeno-específicas. ^{5, 6, 7} y c) la región de control larga (LCR), que contiene los genes implicados en la regulación de la transcripción y replicación. La clasificación de los distintos genotipos de VPH se hace mediante la homología de secuencias, principalmente las correspondientes a los genes E6, E7 y L1 ^{1, 2}

Los diferentes genotipos de VPH se pueden agrupar en: **VPH de bajo riesgo**; 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, y CP6108 y **VPH de alto riesgo**; 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82, mientras que los tipos 26, 53 y 66 se consideran como probables carcinógenos. Puede infectar todo tipo de epitelios y el aspecto macroscópico e histológico que presentan la lesión varía con el sitio de infección y el genotipo viral presente ⁸. (Ver tabla 1)

Las infecciones por VPH de bajo y alto riesgo se presentan generalmente entre mujeres de 15 y 35 años, aproximadamente el 80% de estas infecciones son transitorias, y solo los genotipos virales de alto riesgo progresan a un carcinoma invasivo ⁸

La principal vía de transmisión es la sexual y su frecuencia se relaciona con ciertos factores de riesgo asociados a esta infección entre los que se incluyen: el número de parejas sexuales y/o el inicio de actividad sexual en edad temprana, uso de anticonceptivos orales, tabaquismo, inmunocompromiso celular, edad y presencia de otras enfermedades de transmisión sexual ⁹. Sin embargo también se transmite por contacto directo con la piel infectada, por contacto con material contaminado, por transmisión vertical, por fómites y por instrumental médico contaminado ^{2, 3}.

De acuerdo a las variaciones en su material genético se han identificado más de 100 genotipos de VPH, de los cuales por lo menos 40 infectan la región ano

genital de mujeres y varones, y aproximadamente 15 de estos se reconocen como virus oncogénicos ^{3, 10}

Tabla 1. Asociación entre genotipo aislado y lesión observada.

Lesión	Genotipos
Verrugas cutáneas.	1,2,3,4,7,10,13,28,29,38
Condiloma acuminado.	6, 11
Neoplasia intraepitelial cervical.	6,11,16,18,30,31,33,35,39,40,42,45,51,52,56
Carcinoma escamocelular de cérvix.	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56
Adenocarcinoma de cérvix.	18
Carcinomas y neoplasias intraepiteliales vulvares.	16, raro 6 y 11
Carcinomas y neoplasias intraepiteliales anales.	6, 16,11,18,33

El virus tiene un periodo de incubación de 2 a 6 meses, puede o no producir una lesión primaria y aún cuando la lesión se hace presente esta puede remitir espontáneamente o persistir por un tiempo prolongado y después desaparecer, se considera que en el 50% de los casos no se requiere tratamiento alguno debido a que se resuelven espontáneamente ⁸.

La persistencia de la infección en cérvix, vagina o vulva por la infección con ciertos genotipos de los virus considerados como oncogénicos es el principal factor de riesgo para generar lesiones epiteliales pre-malignas y malignas ^{11, 12}

2.1.2. EPIDEMIOLOGIA

La epidemiología de las infecciones del VPH no se conoce con precisión ya que las técnicas para la investigación seroepidemiológica son insuficientes y el diagnóstico de las infecciones no genitales se realiza en base al examen físico y posteriormente al examen histológico. La condición de una infección latente asintomática o sin evidencia histológica no favorece un dato real de infección por el virus ya que sólo puede ser diagnosticada por técnicas moleculares que no son rutinariamente utilizadas. Sin embargo, las infecciones por el VPH están distribuidas en toda la población y algunas de ellas están asociadas con procesos malignos del tracto genital ⁹.

La infección por el virus del papiloma humano es la infección viral de transmisión sexual más común. Las personas infectadas son usualmente asintomáticas. Las manifestaciones de la enfermedad incluyen verrugas y displasias citológicas en cérvix y ano. La persistencia de la infección ano genital se ha asociado con el avance de las neoplasias cervicales a carcinoma invasor ano genital y cervical ¹³.

La prevalencia de infección por VPH alrededor del mundo en mujeres va de un 2% a un 44%, siendo más alta entre mujeres jóvenes, decayendo conforme la edad aumenta. El cáncer cervicouterino (CaCu) en la mujer latinoamericana es un problema grave de salud pública que ocupa una incidencia y mortalidad alta en mujeres en edad reproductiva. La población hispana que radica en estados

unidos y Centroamérica ha incrementado notablemente las cifras hasta tres veces la incidencia y mortalidad por CaCu ¹⁴.

Se estima que a nivel mundial se presenta una incidencia anual de 6 millones de infecciones nuevas con VPH y por lo tanto representa una de las principales infecciones de transmisión sexual. En el 2002 la OMS publicó que entre el 65% al 70% de la población sexualmente activa a estado en contacto con algún genotipo del VPH sin que todos desarrollen la infección. En relación a infecciones subclínicas puede ser de hasta un 40% de la población femenina con tasas de infección de un 10 al 15%; el tumor más frecuente es el de cérvix (11.6%) seguido del de vagina y vulva 3.7% ^{9, 15, 16}.

La incidencia del CaCu en los países de America Latina varía de acuerdo al país, nivel socioeconómico, si es buscado en población rural o urbana, una de cada 1,000 mujeres de 35 a 55 años padece CaCu, si analizamos la tasa de incidencia por cada 100,000 personas, Centroamérica tienen el 51.1% y específicamente México el 21.4%. En América latina se ha incrementado la incidencia de CaCu entre los 35 y 65 años en algunos países como México se han documentado casos desde los 20 años, pero predominan en la cuarta década de la vida. El riesgo aumenta si el parto ocurre antes de los 16 años, así como en los casos de multiparidad sobre todo en mujeres con más de 3 hijos¹⁴.

Al rededor de 500,000 nuevos casos de cáncer cervical son detectados anualmente, por lo que se puede decir que el riesgo relativo de la asociación entre infección por VPH y neoplasia cervicouterina oscila en un rango del 20 al 70%^{9, 15, 16}. Además, la incidencia de infección con tipos virales oncogénicos parece ser más alta que aquella con tipos virales no oncogénicos^{2, 3, 17, 18}. De las mujeres infectadas con VPH el 25% desarrollan una lesión intraepiteliales de bajo grado (LIEBG) y solo el 2% de estas progresarán a lesiones intraepiteliales de alto grado (LIEAG); esto significa que de aquellas mujeres que en alguna ocasión adquirieron la infección por VPH y progresaron a lesión, sólo el 5 o 10% de ellas desarrollarán cáncer cervicouterino^{19, 10}

En los Estados Unidos la incidencia estimada de carcinoma in situ es de 55 casos por cada 100,000 mujeres al año y la de carcinoma invasor se estima 15 casos nuevos por cada 100,000 mujeres al año, calculándose una incidencia de 1-3 millones de personas con condilomas acuminados. En la población española se reporta 2.5% de cáncer cervicouterino (CaCu). En Europa las cifras correspondientes son 155 millones en mujeres mayores de 15 años, 15.5 millones de mujeres portadoras, 1.5 millones con lesiones de bajo grado, 85,000 mujeres con lesiones de alto grado y 23,000 casos de carcinoma invasor.

El Instituto Nacional de Estadísticas en España contemplaba de 1993 a 1996 una incidencia para cáncer de 1,408 casos por 100,000 habitantes. El Colegio Americano de Patología estimaba en el 2006 cerca de 1 millón de mujeres al año diagnosticadas con NIC I y 500,000 con CaCu, tomando en cuenta la

proporción de 1000 mujeres ellos aportan la siguiente frecuencia 1.2% NIC I, 1.5% NIC II y III ^{20, 21, 22}

Actualmente la infección por VPH se reconoce como la principal causa para el desarrollo de cáncer del cervicouterino; los genotipos de bajo riesgo aislados con mayor frecuencia incluyen al VPH 6 y 11 y estos raramente conllevan a la aparición de cáncer, sin embargo los genotipos de alto riesgo relacionados con desarrollo de cáncer identificados en mayor frecuencia son VPH 8, 16, 18, 31 y 45, el lapso para que progresen a cáncer desde la aparición de la lesión es de 10 a 20 años y esto depende de una variedad de factores que actúan conjuntamente con los tipos de VPH asociados al mismo ^{22, 23, 24, 25}

El cáncer cervical ocupa el segundo lugar en frecuencia con respecto a los cánceres que afectan a la mujer en todo el mundo, teniendo una estrecha relación con la infección por el VPH en la mayoría de los casos. Se estima que cerca del 10% de las mujeres de la población general han tenido contacto alguna vez en su vida con el VPH y que el 70% de las que desarrollan cáncer cervical invasivo se infectaron con los genotipos virales 16 o 18 ⁹, ya que estos genotipos se han encontrado aproximadamente en el 50-70% de los carcinomas. Los VPH de alto riesgo se han identificado en un 90 a 95% en lesiones invasivas del cérvix mientras que a nivel vulvar y vaginal se encuentran con mayor frecuencia los genotipos 11 y 17 ^{6, 7, 9}.

A nivel mundial cada año se diagnostican alrededor de 490,000 mujeres con cáncer cervical, de las cuales más de la mitad mueren a consecuencia de esta enfermedad ²⁶.

En nuestro país, el cáncer cervical ocupa el primer lugar siendo más frecuente en mujeres de 15 a 44 años. A escala mundial México tiene una de las tasas más altas de mortalidad por cáncer cervical. Se estima que cerca de 37.5 millones de mujeres se encuentran en edad reproductiva, motivo por el cual se encuentran en riesgo de contacto con el virus y en algunos casos de desarrollar cáncer cervical; estudios recientes indican que más de 12,500 mujeres son diagnosticadas con cáncer cervical al año de las cuales 5,700 mueren a causa de la enfermedad ^{6, 27, 28, 29}.

El condiloma acuminado es una de las lesiones más comunes asociada con la infección por los genotipos 6 y 11 de bajo riesgo oncogénico, en nuestro país la prevalencia de esta infección es alta (65%), razón por la cual se han realizado ya algunos estudios intentando determinar los genotipos involucrados en las diferentes manifestaciones de la enfermedad; en el año 2008 se realizó un estudio en un grupo de pacientes que presentaban lesiones de condiloma acuminado en la región genital, se evaluaron 90 biopsias, encontrándose el genotipo 6 en el 54.2% de las muestras, seguido del genotipo 11(36.1%) y en tres casos (4.2%) se encontró coinfección. Estos resultados apoyan la existencia de un vínculo entre el desarrollo de verrugas genitales con la infección por los genotipos 6 y 11 de VPH ³⁰.

En el año 2004 en el Instituto Nacional de Perinatología (INPer) se realizó un estudio para identificar los genotipos de VPH presentes en 63 biopsias de cérvix de pacientes con evidencia citológica, colposcópica e histopatológica de infección viral, realizando simultáneamente un análisis ultra estructural de los cambios celulares asociados, para lo cual se empleó una técnica de Hibridación *in situ* (HIS) comparada con los resultados patológicos de neoplasias intraepiteliales cervicales, encontrando en un 24% los genotipos 6 y 11². Técnicas como estas han sido empleadas con anterioridad, por ejemplo en otro estudio en el cual el objetivo fue hacer una comparación entre los resultados obtenidos empleando técnicas de biología molecular como la captura de híbridos y la citología, se concluyó que la citología de células cervicales es un método subjetivo y poco sensible para establecer el diagnóstico de la infección por VPH cuando se trabaja con muestras de pacientes que tienen una infección subclínica, mientras que el empleo de la técnica de captura de híbridos puede resultar importante en la identificación de ciertos genotipos de VPH precursores de cáncer³¹.

2.1.3. PATOGENIA.

El VPH afecta piel y mucosas, el aspecto histológico varía según la localización de la infección y el tipo de virus. Se establece un periodo de incubación entre 6 semanas y 2 años, donde la célula diana es el queratinocito, iniciándose el ciclo celular cuando el virus se une a su célula blanco a través de un receptor de membrana la molécula A6- integrina. Una

vez ocurrida la infección del virus se establece en el núcleo de las células basales fuera de los cromosomas del hospedero. A medida que las células se diferencian y desplazan hacia la superficie del epitelio, inician la replicación en coordinación con la división celular, conforme van migrando hacia el estrato espinoso del epitelio, la replicación viral se estimula, produciendo la acumulación de viriones dentro del núcleo. Suele haber integración en la región E1 y E2 del genoma, la división del gen E2 produce su inactivación con la consecuente pérdida de la función lo que permite la activación de los productos E6 y E7 ^{32, 33}.

Las regiones E6 y E7 son esenciales para los procesos de oncogénesis, ya que ellas producen las proteínas necesarias para la transformación, el E6 se une al gen supresor de tumores p53 y el E7 se une a otro gen supresor de tumores el producto del retinoblastoma y les impide actuar de forma normal. La proteína p53 es un importante regulador de la replicación celular y es conocido como el principal represor de tumores en el ser humano, es capaz de detectar daño sufrido por el ADN en cualquier célula del organismo. Si el daño ha sido en una etapa del ciclo celular en la que aun no ha ocurrido la replicación del ADN, p53 envía una señal para que el ciclo celular se pare y el daño celular sea reparado, cuando el daño es después de la replicación de ADN, p53 envía una señal para detener el ciclo celular y como a este nivel es imposible reparar los daños la célula sufre un proceso de apoptosis, con esto no se permite que los daños causados al ADN sean heredados a celular hijas que pueden ser el origen de un tumor maligno ^{12,32,15,16}.

La proteína E7 se une al producto del gen supresor de retinoblastoma, el cual es un factor regulador del ciclo celular ya que se une directamente al factor transcripcional E2F, que a su vez induce la transcripción de elementos involucrados con la replicación celular, la proteína E7 de los VPH de alto riesgo tienen una alta afinidad por el sitio de unión de retinoblastoma a E2F, cuando la célula ha sido infectada se unen a este sitio impidiendo que éste mantenga controlado a E2F, el cual queda libre e induce la replicación celular continua. De esta manera E6 y E7 cooperan eficientemente en la transformación de las células produciendo tumores cervicales a largo plazo ¹².

La expresión de los genes tempranos ocurre a lo largo de todos los estratos epiteliales, la expresión de los genes tardíos se observa únicamente en los queratinocitos totalmente diferenciados de los estratos córneos, los VPH no presentan un fase lítica por lo que se valen de las características propias de las células que los albergan para propagar su progenie, la cual es liberada cuando las células terminales del estrato córneo sufren un proceso de descamación ^{12, 32}

En las lesiones benignas el ADN se localiza en posición extra cromosómica del núcleo celular, por el contrario en las lesiones grave, el ADN se encuentra integrado en el cromosoma celular, el ADN viral se inserta rompiendo la región E2, esta circunstancia puede explicar la malignización de la lesión ya que la expresión de la proteína E2 regula la expresión de las proteínas supresoras de tumores que son p53 y el oncogén del retinoblastoma. Otros mecanismos de

patogenicidad oncológica son la inestabilidad cromosómica, la colaboración de oncogenes activados, la metilación de distintas zonas del ADN viral y celular y diversos factores hormonales e inmunogenéticos ^{1, 11}.

En los pacientes con VPH se han descrito diversas alteraciones inespecíficas del sistema inmunitario entre ellos la disminución del factor de necrosis tumoral alfa, interleucina 1 y los interferones, las que normalmente contribuyen al control de las infecciones. Las reacciones de hipersensibilidad retardada y las respuestas linfoproliferativas y citotóxicas frente los antígenos de VPH especialmente E6 y E7, son frecuentes en los pacientes infectados pero no se detectan en todos ellos ¹⁵

2.1.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

a) Verrugas ano genitales:

Son pápulas cutáneas exofíticas, hiperqueratósicas de aspecto carnososo y coloración grisácea con un pedículo corto y ancho o múltiples con bordes bien delimitados, La incidencia se presenta más entre mujeres de 20 a 24 años se reportan 1200 casos x 100 000 pacientes, el aspecto va desde un color a perlado y liso, su tamaño es desde 1 mm, en las mujeres las lesiones aparecen en el introito vaginal , vulva, periné, ano, cuello uterino y con menor frecuencia en los labios mayores y clítoris, las verrugas causadas por los tipos 16 y 18 son lesiones pequeñas, blanquecinas con bordes mal definidos ^{21. 34,35,}

b) Condilomas acuminados:

También conocidos como verrugas genitales, se caracterizan por la presencia de excrecencias carnosas localizadas en las mucosas del área ano genital, suelen ser de aspecto exofítico generalmente pediculado y papulares en ocasiones aplanados, se presentan bajo el aspecto de una lesión hiperplásica carnososa y húmeda de color rosa o blanca o bien se pueden presentar como lesiones hiperqueratósicas o pápulas pigmentadas, que tienen forma semejante a una coliflor. En su evolución pueden permanecer indefinidamente con las características ya mencionadas, involucionar o extenderse de forma progresiva. En este último caso pueden formar placas infiltradas y de aspecto tumoral. El segundo aspecto clínico es su presentación en pequeñas pápulas, múltiples. Suelen ser induradas al tacto y se localizan en los límites de la mucosa de la piel.^{37, 38, 39}

En la mujer aparecen en la horquilla vulvar y en labios mayores y menores, por las condiciones de humedad del área genital pueden propagarse a toda la vulva, incluso al perineo y área perianal. En la vulva y perineo pueden manifestarse como condilomas exofíticos o como lesiones de tipo papuloso, micropapular o macular, redondeadas, levemente sobreelevadas, estos suelen ser benignos pero pueden contener 5% de virus oncogénicos.^{38, 39, 40}

Las lesiones subclínicas en la mujer se localizan en la mayoría en las superficies de las mucosas y se manifiestan por manchas de color blanco y lesiones aplanadas y múltiples. Microscópicamente se caracterizan por un

epitelio escamoso acantótico y algunas veces hiperqueratótico, se observan múltiples capilares en las formaciones papilomatosas, coilocitos con halos citoplasmáticos, multinucleados, con cromatina con aspecto de vidrio esmerilado. La actividad mitótica en la capa basal y media, produce muchas veces lesiones subclínicas que se hacen evidentes al examen colposcópico tras la aplicación de ácido acético al 5%^{34, 40}.

2.1.5 Cáncer y VPH

Actualmente hay mas de 100 genotipos de VPH, algunos de ellos los considerados como de alto riesgo afectan al epitelio escamoso y estratificado por lo que se han asociado al 99% de los CaCu. Los genotipos de bajo riesgo se relacionan a lesiones benignas como condilomas y NIC menores.⁴¹

Actualmente la infección por VPH se reconoce como la causa más importante del cáncer del cuello uterino, los genotipos que se clasifican como de bajo riesgo raramente conllevan a la aparición de cáncer, los más comunes incluyen a VPH 6 y 11. Los genotipos de alto riesgo más frecuentemente identificados son VPH 16, 18, 31 y 45, el lapso para que progresan a cáncer es de 10 a 20 años, los estudios sugieren que el que una mujer desarrolle cáncer o no, depende de una variedad de factores que actúan conjuntamente con los tipos de VPH asociados al mismo. Las lesiones intraepiteliales incluyen: Los de bajo grado NIC I o displasia leve, NIC II (displasia moderada) y NIC III (displasia grave y carcinoma in situ). Las lesiones NIC I y II son autolimitables, las NIC III

tienen una historia natural distinta, las LIEAG incluyen las llamadas neoplasias cervicales intraepiteliales.^{38, 42, 43}

El CaCu es un problema de salud pública, la mortalidad es alta en América Latina y se asocia este problema al VPH en un 90%, la infección por el virus precede en el tiempo a la aparición de la neoplasia intraepitelial cervical, se considera al epitelio escamoso como el área más vulnerable a la infección, la asociación entre VPH y cáncer se sugirió por primera vez en la década de los 70's, desde entonces se han desarrollado numerosos estudios que muestran una evidencia poderosa sobre el papel etiológico, usando métodos de hibridación se han descubierto secuencias de nucleótidos del VPH del 10 al 30% y estudios de PCR hallan una prevalencia del 46% en las LEIBG; se ha encontrado genoma viral en cérvix en 29- 75% de casos de LEIAG 99% de los carcinomas escamocelulares y 90% en los adenocarcinomas invasivos de cérvix. Algunos genotipos de VPH poseen la capacidad de actuar en la transformación maligna, se requieren ciertos eventos genéticos para que esta ocurra, en estudios se menciona que el 30% de las mujeres positivas al genotipo VPH 16 desarrollan LIEAG y se relaciona a carcinoma escamocelular queratinizante, el genotipo VPH 18 se encuentra en adenocarcinomas, carcinomas adenoescamosos y carcinomas de células pequeñas. Tal es el caso reportado den un estudio reliazado en una población de mujeres chilenas con diagnostico histopatológico de adenocarcinoma cervical, en el cual se busco conocer el genotipo de VPH relacionado con esta patología, en un total

de 38 biopsias se identificó al genotipo 16 como el más frecuente (81.55%), seguido del genotipo 18 (13.1%)⁴⁴.

A nivel vulvar las lesiones condilomatosas contienen VPH 6 y 11, el carcinoma in situ contiene VPH 16 en 60 a 90% de los casos. Los carcinomas de vulva son minoría y se relacionan con carcinomas verrucosos.^{38, 42}

El CaCu es más común después de los 35 años, lo que sugiere infección a temprana edad y progresión lenta a cáncer. Entre los factores predisponentes se ha identificado; el uso prolongado de anticonceptivos orales, coinfección con otros virus en cérvix, como el del herpes simple (HSV) tipo 2, citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano tipos 6 y 7 (HHV-6 y HHV-7). La carga viral de VPH correlaciona directamente con la severidad de la enfermedad, el VPH 16 puede alcanzar una carga viral más alta que otros tipos virales y representa el 27% del efecto de los factores subyacentes para el desarrollo del tumor. El CaCu de células escamosas es el más común, mientras que el 10 % de los casos son de origen glandular, es decir adenocarcinoma. El adenocarcinoma invasor puede ser puro o mezclado con carcinoma de células escamosas, con lo que se denomina carcinoma adenoescamoso^{9, 16, 45, 46}.

Mucho se ha hecho énfasis en que la evolución a malignidad de los epitelios infectados con VPH depende de la asociación de varios factores y no sólo de la presencia de genotipos oncogénicos entre los cofactores necesarios para favorecer la progresión a malignidad del epitelio afectado, entre los que

se mencionan, la conducta sexual de riesgo (edad de primer coito, relaciones sexuales sin preservativo, promiscuidad, varones no circuncidados, malos hábitos higiénicos), respuesta inmunitaria y susceptibilidad genética, edad, tabaco, uso de anticonceptivos orales, multiparidad, estado de inmunosupresión, VIH, enfermedades de transmisión sexual como Chlamydia y Herpes virus^{30, 47-49}.

Para hablar de cáncer habrá que definir a la transformación confinada al espesor del epitelio, en 1949 Papanicolau introduce los términos de displasia en histopatología para designar dichos cambios, estableciendo una clasificación de leve, moderada y severa o grave. Sin embargo es hasta 1967 cuando se propone el término de neoplasia intraepitelial cervical (NIC), agrupándose en 3 grados, la ventaja principal es el reconocimiento de la unidad del proceso patológico lo cual conlleva a una relación con las técnicas terapéuticas. Esta clasificación ha sido la más utilizada a nivel internacional; se llama a NIC I o lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIEBG) cuando el resultado es negativo para lesiones intraepiteliales o malignidad, aquí no hay evidencia de neoplasia independientemente de si se observan o no microorganismos u otros hallazgos no neoplásicos, compromete 2/3 superiores del epitelio, NIC II o displasia moderada compromete 2/3 inferiores del epitelio y NIC III o displasia in situ cuando compromete todo el epitelio, estas últimas consideradas lesión intraepitelial de alto grado^{50, 51}.

Los grados de NIC involucran un cambio etiopatogénico, diagnóstico, pronóstico y terapéutico, el NIC es un cambio en el epitelio que evoluciona como una entidad continua que tiene su origen en la zona de transición de los epitelios. El cambio ocurre en una célula y crece en la zona de transformación que es la metaplasia situada entre el epitelio escamoso original y la zona de transición actual, el NIC puede extenderse al canal endocervical, pero en sentido opuesto, se detiene en su desarrollo a nivel de la unión escamocolumnar original ya que este epitelio estratificado posee ciertos polipéptidos que impiden la proliferación de las células neoplásicas en el NIC, a medida que progresa la lesión se extiende en la superficie epitelial y se acorta el lapso para transformarse en cáncer invasor, así mismo disminuyen las probabilidades de que permanezca como NIC o que desaparezca sin tratamiento, una vez que aparece el cáncer invasor al romper la membrana basal, se trata ya de una enfermedad distinta con pronóstico y tratamiento propio ^{24, 51}.

Las lesiones de alto grado incluyen las llamadas neoplasias cervicales intraepiteliales NIC II Y NIC III, (displasia grave y carcinoma in situ), las lesiones de bajo grado incluyen los cambios citológicos característicos de la lesión de VPH o NIC I o displasia leve, estas lesiones contienen en su mayor parte virus de bajo riesgo, razón por la que raramente progresarán. La historia natural de la oncogénesis cervical podría seguir el modelo según el que, al iniciar su actividad sexual, la mujer puede ser contagiada por un virus de alto riesgo que en la mayoría de los casos da lugar a una infección transitoria de 6 a 8 meses, de forma ocasional la infección desarrollará una lesión visible al

microscopio, sin embargo los VPH de alto riesgo ejercerán su actividad oncogénica integrándose al genoma, esta interacción en células proliferativa, como las del cuello uterino impide la reparación correcta del ADN y conduce a una inestabilidad genómica y aumenta la probabilidad de desarrollar mutaciones específicas y esenciales para la progresión de cáncer invasor, aunque como ya se ha descrito son necesarios otros cofactores para la persistencia y progresión del mismo. Los tipos de VPH mas asociados a cáncer son 16 y 18, hasta en un 85%.^{24, 26, 51}

Se consideran a las adolescentes y a las embarazadas como grupos de riesgo que requieren vigilancia estrecha y seguimiento clínico. Las adolescentes tienen bajo riesgo de un cáncer cervical pero citológicamente se diagnostican con frecuencia lesiones intraepiteliales con tendencia a la curación. Las mujeres embarazadas tiene riesgo mínimo de progresar a un cáncer invasor durante el embarazo, se reporta que 0.05% de todos los embarazos están asociados con cáncer cervical^{21, 26, 52, 53}

2.1.6. VPH EN EL EMBARAZO

Aun existe controversia entre si el embarazo tiene o no un importante efecto sobre la adquisición de la infección por VPH, algunos autores mencionan que se favorece la aparición de condilomas en la región anogenital debido a que durante los dos primeros meses de gestación, la inmunidad esta disminuida; otros relacionan los cambios hormonales y la vaso congestión vulvar debidos a el embarazo, con la aparición de síntomas locales de infección y al desarrollo

y proliferación de condilomas, se sabe que la evolución de la infección por el VPH puede verse influenciada por cambios fisiológicos e inmunológicos que ocurren a nivel de epitelio cervical durante el embarazo⁵⁴.

Estudios recientes han informado de prevalencias de infección por VPH en mujeres embarazadas que van desde 5 hasta 80%, con mayor riesgo en menores de 26 años, lo que sugiere la posibilidad de que el proceso fisiológico del embarazo modifique algunas características del hospedero e incremente el riesgo tanto de infección como de persistencia de la infección por VPH⁵⁵.

Aproximadamente 1 % de las mujeres con cáncer cervical están embarazadas al tiempo del diagnóstico, el aparente incremento de incidencia de cáncer invasivo en gente joven y el inicio cada vez más tardío de la primera gestación induce a pensar que este pueda ser un problema cada vez más frecuente y plantea la necesidad de practicar un tamizaje citológico en la primera visita de cada gestación. El cáncer invasivo de cérvix durante la gestación es una amenaza para el feto y la madre pero poco frecuente, su incidencia varía de 1 a 15 casos por 10,000 embarazos⁵².

El embarazo es una excelente oportunidad para detectar mujeres con anomalías citológicas que de otra manera se hubiesen ignorado, estas son mucho más comunes durante el embarazo y complican el 5% de las gestaciones. Es necesario establecer pautas de conducta correctas para la

evaluación de una citología anormal en el embarazo, ya que puede producir en la paciente una ansiedad por los efectos desfavorables sobre madre e hijo ^{53, 56}. Es importante considerar que el embarazo altera la respuesta inmunitaria y debido a esto puede estimular la replicación viral; la prevalencia de la infección en el embarazo es altamente discordante debido a las diferentes técnicas usadas en el diagnóstico, algunos estudios mencionan que la prevalencia de VPH es la misma en mujeres embarazadas y en las no embarazadas; se ha sugerido que la prevalencia de VPH en el tracto genital inferior es comparable entre las mujeres embarazadas y las no embarazadas, con un porcentaje del 20 al 30% , otros estudios sugieren que la prevalencia de VPH en la gestación es más alta que en el periodo posparto ^{57, 58, 59} variando entre un 45-50% frente al 31% en el puerperio. Algunas teorías que se han postulado para explicar estos hallazgos implican que las gestantes tienden a tener menos compañeros sexuales que las no gestantes y entonces tienen menos posibilidades de adquirir nuevas infecciones por VPH, la posibilidad de progresión de las lesiones cervicales intraepiteliales durante el embarazo es mínima, ante un diagnóstico de NIC I Y II las posibilidades de malignización son mínimas y se puede referir a estudio posparto en vez de seguimiento citocolposcópico ante parto. Si se diagnostica un cáncer invasivo la estrategia a seguir dependerá de las semanas de gestación del producto ^{26, 53}.

En México la prevalencia de mujeres embarazadas infectadas por el virus del papiloma humano (VPH) se encuentra cercana al 25%¹⁸. A nivel mundial hay estudios que señalan una prevalencia menor, por ejemplo en España, un

estudio en población abierta de más de 800 embarazadas mostró una prevalencia de solo el 6.5%⁵³.

La repercusión más importante de la infección por el VPH en mujeres embarazadas es el riesgo de transmisión vertical. Estudios recientes sobre los mecanismos de transmisión vertical no han sido concluyentes; no obstante, el consenso indica que los recién nacidos (RN) están expuestos a la infección genital maternal y por lo tanto tienen el riesgo de infectarse. Por otra parte, tampoco está claro con qué frecuencia la infección perinatal progresa a enfermedad derivando en la presencia de lesiones clínicamente evidentes en el RN⁶⁰. Actualmente el VPH es considerado como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de carcinoma oral de células escamosas, especialmente en pacientes jóvenes y personas con carcinoma de amígdalas. La relación de la infección por transmisión vertical y el riesgo para el desarrollo de estos cánceres no se ha determinado claramente⁴³.

Independiente a la posible infección del RN al momento del paso por el canal de parto, también es necesario considerar que la transmisión vertical de VPH in útero es posible. Aunque el mecanismo específico a este nivel no ha sido identificado, teóricamente el virus puede adquirirse hematógicamente y por vía materna ascendente⁽³⁰⁾. La presencia de verrugas genitales es el único predictor independiente para la identificación del DNA viral, su identificación determina un riesgo para la presencia del virus en genitales o en cavidad oral de los RN^{35, 60, 61}

2.1.7. DIAGNOSTICO DEL VPH

Las lesiones de VPH pueden afectar de forma aislada o multicéntrica y multifocal a cualquier parte de tracto genital inferior y región perianal por lo que se debe hacer un estudio exhaustivo de los genitales femeninos. La exploración física deberá incluir una inspección minuciosa de toda la vulva y región perianal y un examen detallado con un espéculo del cuello uterino, dada la frecuente multicentricidad de la lesión ³⁶.

Aunque el diagnóstico es clínico en la mayoría de los casos, la posible presencia de infecciones subclínicas, asintomáticas o latentes, han favorecido el desarrollo de una variedad de técnicas de tamizaje diagnósticas, entre las que destacan las morfológicas para detección de virus (citología, colposcopia, histopatología), inmunohistoquímicas para detección del antígeno viral en la lesión y las basadas en la detección de ADN viral.

Los métodos de diagnóstico para VPH comúnmente empleados (la citología, el examen colposcópico, inmunohistoquímica) , presentan baja sensibilidad y especificidad, lo que limitan la detección definitiva del virus ³¹; mientras que el uso de las pruebas serológicas es limitada debido a la diversidad de genotipos y la incapacidad de distinguir una infección actual de una pasada ⁴⁵

En la actualidad son varias las técnicas de biología molecular que se emplean en forma eficiente para el diagnóstico de los diferentes genotipos de virus del papiloma humano que cuando persisten se consideran necesarias para

corroborar o prevenir el posible desarrollo de cáncer del cuello uterino, o bien para llevar a cabo estudios de epidemiología molecular^{34, 45}

Las técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos como la captura de híbridos o la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), apoyan y complementan el diagnóstico clínico, con la ventaja de analizar muestras citológicas que sugieran infección o bien muestras de biopsias⁶¹. La captura de híbridos ha sido aprobada por la Agencia de Drogas y Alimentos (FDA) de los EU, y es una técnica ampliamente utilizada que permite identificar el grupo de VPH oncogénicos, entre los que se encuentran los tipos 16 y 18, y los tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 sin distinguir cual o cuales genotipos están presentes en la muestra clínica^{15, 16}. A pesar de su alta sensibilidad, estudios recientes han demostrado que existe inexactitud analítica principalmente cercana al valor de corte debido a una reacción cruzada por la mezcla de sondas que se emplean en la reacción^{46, 61, 62}

La PCR es una herramienta de gran utilidad en la detección del VPH, generalmente se emplean iniciadores que amplifican la regiones conservadas del gen L1 (GP5+/GP6+, MY09/MY11/HMB01, PGMY09/PGMY11 y SPF1/SPF2), los cuales amplifican un amplio número de genotipos virales, pero con la necesidad de realizar una genotipificación subsecuente mediante secuenciación directa, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) o por métodos de hibridación^{12, 62, 63}. Con la introducción de nuevos métodos de genotipificación de VPH, por modificaciones en los iniciadores o

por la combinación de estos en las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos se ha incrementado notablemente la sensibilidad y especificidad en la detección del virus. De ahí la importancia de utilizar técnicas que faciliten la identificación del virus en pacientes con sospecha de infección con lo cual se espera un incremento en los porcentajes de detección ^{64, 65, 66, 67}

Gracias a el empleo de este tipo de técnicas, se han logrado realizar algunos estudios que han aportado evidencia importante de la frecuencia de genotipos encontrados en diversas poblaciones incluyendo las mujeres embarazadas, mencionando un mayor aislamiento de los genotipos 6 y 11, así como de los genotipos oncogénicos principalmente el genotipo 16 y 18 hasta en un % y 36% respectivamente ^{68, 69}

3. JUSTIFICACIÓN

El espectro de enfermedades ocasionado por la infección por el VPH es muy amplio, e incluye neoformaciones benignas, displasia celular, lesiones malignas y el riesgo de transmisión vertical cuando esta se presenta en mujeres embarazadas. El Instituto Nacional de Perinatología (INPer) atiende pacientes embarazadas de alto riesgo y pacientes con alteraciones ginecológicas, las cuales representan una muestra amplia de la población obstétrica, que permite el estudio de la infección por el VPH en esta población, así como describir la prevalencia y clasificarla por genotipos de bajo y alto riesgo e identificar posibles factores de riesgo determinantes para adquirir la infección que incluso pueden modificar el curso de la enfermedad causada por el virus.

La infección por VPH es una entidad clínica que muchas veces es difícil de identificar clínicamente y que puede pasar desapercibido, es de las enfermedades de transmisión sexual más frecuentes en el mundo. La identificación de lesiones intraepiteliales y tumorales asociadas a genotipos con diferente potencial oncogénico ha demostrado que este virus participa en un número cada vez más creciente de lesiones. De vital importancia es comprender la interacción entre el efecto patogénico viral en la célula huésped con un grupo de cofactores de riesgo, necesarios para la progresión de lesiones. En este sentido es posible intervenir de modo de lograr una conducta preventiva o de diagnóstico precoz. La persistencia viral de los tipos de alto riesgo oncogénico facilitaría la progresión de lesiones culminando finalmente

en el desarrollo de cáncer. La presencia de ciertos genotipos se ha relacionado con el desarrollo de algunas lesiones a carcinomas invasivos.

Desde hace años se cuenta con un sistema de clasificación Bethesda (Ver Anexo) desarrollado específicamente para la identificación de lesiones observadas por citología, pero se reportan hasta un 20-40% falsos negativos. Las técnicas de Biología Molecular presentan una mayor sensibilidad y han sido extensamente utilizadas para detectar la presencia de VPH como un recurso para definir en las pacientes con atipia celular de significado incierto quiénes requieren de colposcopia y biopsia, el propósito de esto es unir criterios sutiles de la citología con la detección del virus por técnicas moleculares.

Actualmente existen avances tecnológicos importantes en relación al diagnóstico de las enfermedades infecciosas, como aquellos que emplean técnicas de diagnóstico molecular, las cuales se basan en la amplificación de ácidos nucleicos, para brindar un resultado confiable y oportuno sobre la presencia del patógeno mediante la detección del material genéticos viral, así como establecer los diferentes genotipos del VPH, los cuales están relacionados con un pronóstico y un tipo de tratamiento diferente para las pacientes infectadas.

El utilizar estos recursos de diagnóstico permite efectuar una evaluación cuidadosa del curso de la infección en la población ginecoobstetra, al poder

detectar el DNA del VPH en una gran variedad de muestras, tales como cepillado vaginal, biopsias y muestras de lesiones verrugosas, con lo cual se puede establecer de manera clara la posibilidad de desarrollar complicaciones posteriores y por consiguiente la necesidad de llevar un mejor seguimiento a estas pacientes, los estudios sobre la historia natural de la infección, durante y después del embarazo, son importantes herramientas para un mejor tamizaje y detección de mujeres en mayor riesgo de desarrollar neoplasias cervicales.

4. HIPÓTESIS

De acuerdo al tipo de estudio que se realizó, no se requiere de una hipótesis.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar el(los) genotipo(s) de VPH que se aísla(n) con mayor frecuencia en mujeres embarazadas infectadas con el virus que acuden a consulta en el INPer

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la frecuencia de detección de genotipos de bajo y alto riesgo en mujeres embarazadas que cursan con infección por este virus.
- Relacionar el tipo de lesión presente con el genotipo de VPH identificado.
- Identificar los factores de riesgo asociados a la adquisición de la infección por el VPH en una población de mujeres embarazadas e infectadas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. TIPO DE ESTUDIO

Descriptivo, Prospectivo y Transversal

6.2. UNIVERSO DE ESTUDIO

Pacientes embarazadas del INPer que cursen con infección corroborada por el Virus de papiloma humano (VPH).

6.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA

6.3.1. INCLUSIÓN

- 1.- embarazadas sin importar las semanas de gestación y que además:
 - a) lleven su atención prenatal en el INPer
 - b) tengan diagnostico de VPH
 - c) Presenten lesiones genitales y/o perianales por VPH
 - d) Presenten lesiones cervicales compatibles con infección por VPH
 - e) Acepten participar en el estudio firmando el consentimiento informado.

6.3.2. NO INCLUSIÓN

- 1.- Pacientes con diagnostico de VPH que al momento de la toma no presenten lesiones activas.

2.- Pacientes que a su ingreso al Instituto reciban tratamiento para erradicar lesiones.

3.- Paciente que no acepte participar en el estudio.

6.3.3. EXCLUSIÓN

1.- Pacientes embarazadas con lesiones sugerentes en las que no se demuestra la presencia de VPH.

2.- Paciente que retire su consentimiento para participar

6.3.4. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

1.- Paciente que abandonen su atención en el INPer

6.4. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se consideraran las muestras de todas aquellas pacientes embarazadas con Infección por VPH, que ingresen para su atención al Instituto durante los meses de Julio a Diciembre de 2010

6.5. VARIABLES

Variable(s) Independiente: Infección por VPH

Variable(s) Dependientes: Genotipo Viral

6.6. METODOLOGÍA.

6.6.1 TOMA DE MUESTRA.

A través de la consulta prenatal, la consulta externa del servicio de Infectología y el servicio de Colposcopia se identificaron mujeres embarazadas con lesiones de condilomas acuminados en la región genital y/o perineal, o con lesiones cervicales compatibles con infección por el VPH. Las pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y aceptaron participar en el estudio mediante consentimiento informado (ver anexo), se le tomaron muestras de cepillados de endocérnix y/o muestras de las neoformaciones genitales para corroboración de la infección por el virus. De las muestras tomadas rutinariamente por el médico se toma una alícuota de 500 μ L y se mantuvieron en refrigeración hasta su procesamiento si este se realizó durante los primeros 15 días posteriores a la toma; si el tiempo de procesamiento se alargó estas se congelaron a 4 °C hasta su procesamiento.

6.6.2 EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción y purificación del DNA de cada una de las muestras en estudio se llevó a cabo mediante lisis enzimática, empleando proteinasa *K* en solución de lisis (10 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.5% SDS y proteinasa *K* 200 μ g/mL) incubándose a 56 °C por 1 hora, enseguida los productos digeridos se sometieron a una extracción con fenol-cloformo. El DNA se precipitó con solución de NaCl 1 M y alcohol absoluto. Finalmente los precipitados se

secaron y se resuspendieron en 50 μ L de solución Tris-EDTA para su cuantificación espectrofotométrica.

6.6.3 AMPLIFICACIÓN UNIVERSAL DE DNA VIRAL EMPLEANDO INICIADORES CONSENSO L1.

Las muestras positivas para β -globina se amplificaron con dos juegos de iniciadores (MY09/MY11, GP5+/GP6+) específicos para regiones diferentes del gen viral L-1 (Tabla 1, Ver Anexo), la cual es altamente conservada entre los diferentes genotipos de VPH.

5 μ L de DNA (100 ng) se sometieron a PCR en un volumen final de 50 μ L. La mezcla de reacción contiene; 20 mM de Tris-HCl pH 8.4, 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 20 pMol/ μ L de cada iniciador y 1 unidad de *Taq* DNA polimerasa. En todos los casos se llevaron a cabo 35 ciclos de amplificación en un termociclador Mastercycler Gradient, la desnaturalización inicial fue a 94 °C/3 min y una extensión final a 72 °C/10 min. (Tabla 1, Ver Anexo)

Los productos amplificados se revelaron en un gel de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron en un analizador de geles (Alpha Imagen). El tamaño de los amplicones esperados se muestra en la Tabla 2. (Ver Anexo)

6.6.4 GENOTIPIFICACIÓN DE VPH

Genotipificación de Virus del Papiloma Humano mediante la técnica Linear

Array HPV Genotyping test (Roche).

La genotipificación de Virus del Papiloma Humano se realizó mediante la técnica Linear Array HPV Genotyping Test (Roche). La metodología se llevo a cabo de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Esta prueba es cualitativa específica para la detección de VPH en muestras clínicas, detecta 37 genotipos virales incluidos 13 de alto riesgo (ver Tabla 3) y se basa en cuatro pasos:

A) Extracción de ADN

El aislamiento y purificación del ADN se lleva a cabo en una columna. El gen de la β globina se aísla de forma simultánea y garantiza la adecuación celular, la extracción y amplificación de cada muestra es procesada individualmente.

De la muestras de raspado cervical se tomó una alícuota de 250 μ l y se colocó en un tubo eppendorf de 2.0 ml, se adicionaron 80 μ l de la solución de lisis, se colocó en un termoblock a 56 °C durante 30 min. El ADN se libera por acción la lisis de muestras de células cervicales bajo condiciones de desnaturalización a temperaturas elevadas, utilizando proteinasa K, al finalizar la incubación, se

pipetearon 250 µl de la solución de trabajo a cada tubo, se mezcló en vortex 10 seg. y se incubó a 70 °C por 15 minutos en un termoblock.

Para lograr la precipitación del ADN, se adicionaron 300 µl de alcohol absoluto a cada tubo y se mezclaron en vortex por 15 seg., se incubaron a temperatura ambiente por 5 min., cada lisado se transfirió a una columna conectada en una bomba vacío, en la cual se adicionan 750 µl de solución de lavado y se hizo pasar vacío para capturar el ADN en el filtro de la columna. Se adicionaron 750 µl de etanol absoluto a cada columna y se hizo pasar nuevamente vacío. Las columnas se transfirieron a tubos de recolección de 2.0 ml y se centrifugaron a 15,000 rpm durante 3 min., para eliminar residuos celulares, la columna se transfirió a un nuevo tubo y se adicionaron 120 µl de solución eluyente, se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. y finalmente para recuperar el ADN se centrifugaron a 15,000 rpm durante 1 min. El ADN queda en la solución, los tubos se etiquetan y refrigeran hasta su uso.

B) Amplificación del DNA blanco mediante PCR.

La prueba utiliza oligonucleótidos biotinilados para definir una secuencia de nucleótidos en la región L1 polimórfica del genoma del VPH, contenidos en la mezcla maestra (MMX), diseñados para amplificar el ADN de 37 genotipos de VPH. Un par de primer adicional se dirige al gen de la β globina.

La MMX viene preparada en una solución que contiene la enzima DNA polimerasa, dNTPS, Mg²⁺, el juego de oligonucleótidos biotinilados de cada genotipo de VPH y el de la β globina, además de la enzima Amperasa, cuya función es la de descontaminar la muestra antes de iniciar la amplificación a

una temperatura óptima de 50 °C. La MMX debe agitarse suavemente invirtiendo el tubo de 10 a 15 veces antes de su uso.

La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 100 µl, el cual contenía 50 µl de MMX y 50 µl del DNA extraído de cada muestra y el de los controles (Control Negativo y Control Positivo). Enseguida los tubos se colocaron en un termociclador donde se llevó a cabo la amplificación. Para la amplificación se siguieron las siguientes condiciones: 1 ciclo de activación para la Amperasa (2 min/50 °C), 1 ciclo de desnaturalización (9 min/95 °C), 40 ciclos de amplificación (30 seg /95 °C, 1 min/55 °C, 1 min/72 °C), y un ciclo de extensión final (5 min/72 °C), el equipo mantiene las muestra a 72 °C hasta el momento de agregar el desnaturalizante.

Al terminar la amplificación, se retiraron los tubos del equipo y se agregó a cada uno 100 µl de solución desnaturalizante, para eliminar cualquier resto de la enzima e impedir de este modo la degradación de los amplicones objetivo.

C) Hibridación de los productos amplificados.

Se transfirieron 75 µL del amplicon desnaturalizado a una charola (dividida en varios canales) que contiene 4 ml de una solución de hibridación y una tira de genotipado de VPH (tira de nilón revestida con sondas de ADN de VPH y β globina, se incubó en baño María a 53 °C/30 min. en agitación (60 rpm). El amplicon marcado con biotina se hibrida con alguna de las sondas sólo si contiene la secuencia correspondiente.

D) Detección

Después de la hibridación se lavaron las tiras para eliminar el material no fijado, utilizando 4 ml de solución de lavado en cada canal, se agitó manualmente y se retiró el sobrenadante de cada división, empleando una bomba de vacío, se añadieron nuevamente 4 ml de solución de lavado a cada canal, se incubaron en baño María a 53 °C/15 min. en agitación (60 rpm), y se retiró el sobrenadante de cada división. Después se añadieron 4 ml del conjugado Streptavidina peróxidasa de rábano picante (SHA-RP), Incubamos a Temp. Amb. /30 min. en un agitador orbital, el conjugado se une al amplicon marcado con biótina e hibridado con las sondas oligonucleótidos sobre la tira, se añadió nuevamente 4 ml de solución de lavado a cada canal, se incubó Temp. Amb. /10 min. en agitación (60 rpm) y se retiró el sobrenadante de cada pozo. Se añadieron 4 ml de substrato (solución que contiene Tetrametilbenzidina (TMB)) y Peróxido de Hidrogeno. Se Incubo a Temp. Amb. /5 min. en un agitador orbital (Protegido de la luz), y se retiró el sobrenadante de cada pozo. Finalmente se añadieron 4 ml de agua desionizada a cada pozo y se mantuvo en un agitador orbital hasta observar la aparición de bandas. Cuando un resultado es positivo la reacción da un color azul en la posición correspondiente a el (los) genotipo (s) presente (s) en la muestra.

TABLA 4. GENOTIPOS DE VPH IDENTIFICADOS CON EL KIT
Linear Array HPV Genotyping test (Roche).

CLASIFICACIÓN	GENOTIPOS DE VPH
ALTO RIESGO	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68.
BAJO RIESGO	6, 11, 26, 40, 42, 53, 54, 55, 61, 62, 64, 66, 67, 69, 70,71, 72, 73 (MM9), 81, 82(MM4), 83(MM7), 84 (MM8), IS39, CP6108.

6.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

En este estudio se utilizó estadística descriptiva. En el caso de los genotipos del VPH se efectuó el cálculo de frecuencias, proporciones y porcentajes.

Para la caracterización de la población, cuando se describieron variables cuantitativas se calcularon medidas de tendencia central y dispersión, y para variables cualitativas se efectuó el cálculo de frecuencias, proporciones y porcentajes.

7. RESULTADOS

Para la identificación de los genotipos de VPH que pudieran estar presentes en las muestras analizadas, se comparó la posición del patrón de las bandas de la muestra clínica, con el patrón de referencia proporcionado por el proveedor (Figura1) de acuerdo a los siguientes pasos:

1. Observación de la banda correspondiente a la β globina, que es un control interno y que nos indica que no hubo inhibición de la PCR (Figura 1);
2. Lectura de las bandas correspondientes en los controles negativo y positivo. Lo que nos valida nuevamente la prueba (Figura 1); en el control negativo la tira permanece blanca en toda su extensión, mientras que en el control positivo aparece una banda azul que corresponde al genotipo 16.
3. Análisis individual de cada una de las tiras correspondientes a las muestras clínicas procesadas (Figuras 2 y 3) .

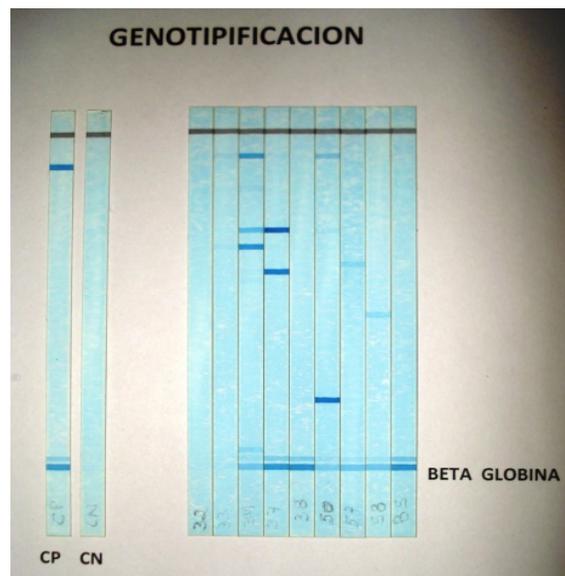


Figura 1. Imagen que muestra la banda de β -globina y la posición de los Controles Negativo (CN) Y Positivo (CP)

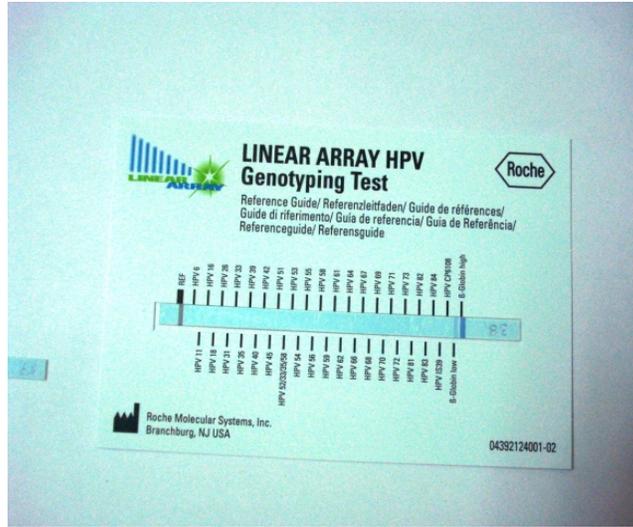


Figura 2. Imagen que muestra el patrón de lectura para correlacionar las muestras problema

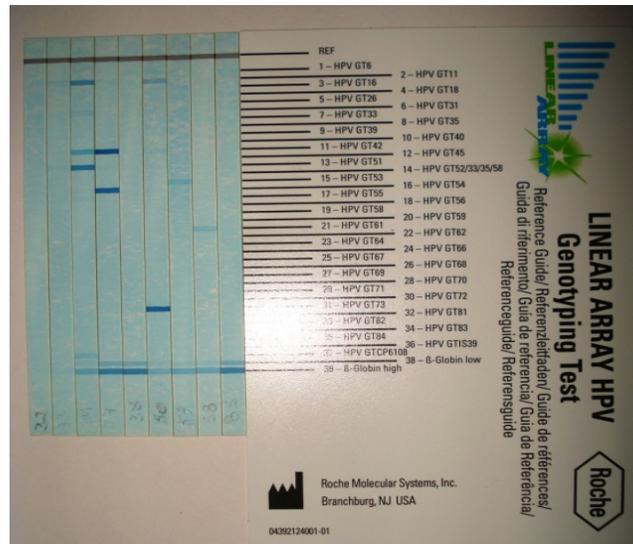


Figura 3. Imagen que muestra las bandas de identificación de genotipos y su comparación con el patrón de lectura para asignar al genotipo de VPH presente.

Una vez obtenidas las lecturas de las muestras clínicas y con el objetivo de una evaluación más amplia, se realizó un análisis de acuerdo a diferentes variables de la población estudiada lo cual se describe en la Tabla 5. (Ver extenso en Anexo) En la tabla 6 se resumen los datos de interés.

Se analizaron un total de 37 muestras de las pacientes incluidas en el estudio, en relación a los genotipos identificados en las muestras clínicas, en 13 (35.1%) pacientes no se pudo determinar el genotipo del VPH, en 10 (27%) se identificó un solo genotipo, en 10 (27%) dos genotipos, en 2 (5.4%) tres genotipos y en otros 2 (5.4%) casos cuatro genotipos por muestra. (FIGURA 4)

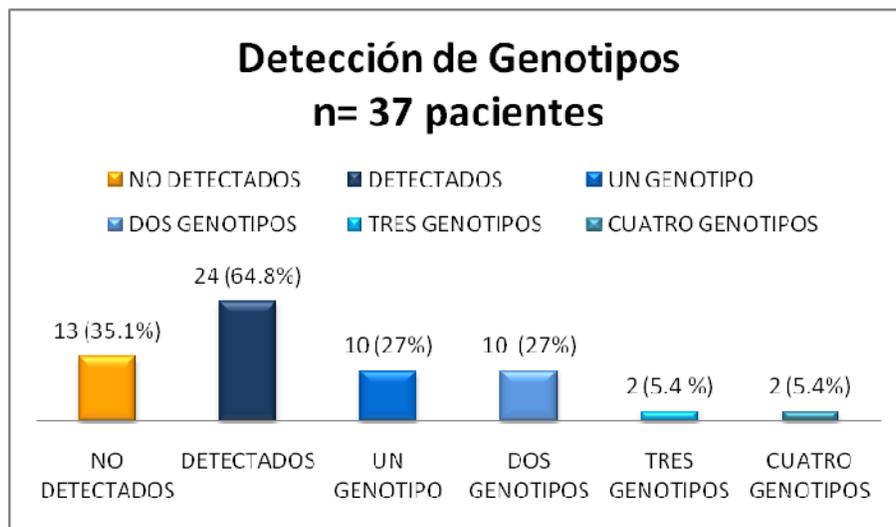


FIGURA 4. Distribución de los genotipos detectados en 37 pacientes infectadas por VPH

TABLA 6 .CUADRO DE FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA INFECCIÓN POR VPH EN 24 PACIENTES CON IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS

CASO	EDAD	IVSA	# PAREJAS SEXUALES	NÚMERO DE GESTA	SDG A LA TOMA	INTERPRETACIÓN FINAL	GENOTIPOS DE VPH IDENTIFICADOS
1	30	30	1	1	32	CONDILOMA	6, 6108
2	15	13	2	2	39	CONDILOMA	6
4	15	14	3	1	35	CONDILOMA	16, 51, 53
7	21	16	2	3	36	NIC I	11, 66
8	21	17	3	2	38	CONDILOMA	53
10	34	30	1	1	17	NIC I	35, 52
12	21	15	2	1	40	CONDILOMA	6, 39
13	33	23	1	2	38	CONDILOMA	6
14	19	16	4	1	39	NIC I	11, 31, 42, 51
17	18	15	3	1	38	CONDILOMA	6
18	25	24	1	2	37	CONDILOMA	40, 56
20	24	19	2	4	30	NIC I	53
21	26	15	1	5	39	LEIBG	6
22	17	17	1	1	22	NIC I	6, 55
24	21	16	1	1	38	CONDILOMA	55
25	30	16	2	3	40	CONDILOMA	61
26	24	14	20	2	40	CONDILOMA	16, 35
29	35	20	1	1	38	CONDILOMA	6, 6108
30	26	22	2	1	30	CONDILOMA	6, 53
32	15	14	1	1	39	CONDILOMA	6, 52, 58, 68
33	35	17	6	3	39	CONDILOMA	13
34	24	17	2	3	37	CONDILOMA	6
35	26	18	20	1	39	CONDILOMA	31, 42, 84
37	27	21	3	1	37	CONDILOMA	6, 18

** Se encuentran resaltados los genotipos de Alto Riesgo

TABLA 7 . CUADRO DE FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA
INFECCIÓN POR VPH EN 13 PACIENTES CON INFECCIÓN
Y SIN IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS

CASO	EDAD	IVSA	# PAREJAS SEXUALES	NÚMERO DE GESTA	SDG A LA TOMA	INTERPRETACIÓN FINAL
3	28	20	3	2	40	CONDILOMA
5	27	21	2	3	36	CONDILOMA
6	28	19	1	1	22	LEIBG
9	25	23	3	2	40	CONDILOMA
11	16	16	4	1	40	CONDILOMA
15	26	16	2	4	38	CONDILOMA
16	31	18	2	3	37	NIC III
19	21	15	15	1	39	CONDILOMA
23	31	22	4	2	37	CONDILOMA
27	24	18	1	4	15	CONDILOMA
28	22	18	2	2	39	CONDILOMA
31	34	15	3	1	38	CONDILOMA
36	32	19	3	3	37	CONDILOMA

La combinación de los genotipos detectados nos permitió separar a las pacientes en tres grupos: uno compuesto por 15 pacientes en donde se detectaron de 1 a 3 genotipos exclusivamente de bajo riesgo (TABLA), un segundo grupo en donde 7 de ellas tenían una combinación mixta de genotipos de alto y bajo riesgo y un tercer grupo compuesto por dos pacientes en que solo se identificaron genotipos de alto riesgo (TABLA).

TABLA 8. DESCRIPCIÓN DE LESIÓN Y GENOTIPOS ENCONTRADOS EN 15 PACIENTES CON INFECCIÓN POR GENOTIPOS DE BAJO RIESGO (BR)

CASO	INTERPRETACIÓN FINAL	GENOTIPOS DE VPH IDENTIFICADOS	TIPO DE INFECCIÓN
1	CONDILOMA	6, 6108	BR
2	CONDILOMA	6	BR
3	NIC I	11, 66	BR
4	CONDILOMA	53	BR
5	CONDILOMA	6	BR
6	CONDILOMA	6	BR
7	NIC I	53	BR
8	LEIBG	6	BR
9	NIC I	6, 55	BR
10	CONDILOMA	55	BR
11	CONDILOMA	61	BR
12	CONDILOMA	6, 6108	BR
13	CONDILOMA	6, 53	BR
14	CONDILOMA	13	BR
15	CONDILOMA	6	BR

TABLA 9. DESCRIPCIÓN DE LESIÓN Y GENOTIPOS ENCONTRADOS EN 7 PACIENTES CON INFECCIÓN MIXTA

CASO	INTERPRETACIÓN FINAL	GENOTIPOS DE VPH IDENTIFICADOS	TIPO DE INFECCIÓN
1	CONDILOMA	6, 52, 58, 68	MIXTA
2	CONDILOMA	40, 56	MIXTA
3	CONDILOMA	6, 39	MIXTA
4	CONDILOMA	16, 51, 53	MIXTA
5	NIC I	11, 31, 42, 51	MIXTA
6	CONDILOMA	31, 42, 84	MIXTA
7	CONDILOMA	6, 18	MIXTA

** Se encuentran resaltados los genotipos de Alto Riesgo

TABLA 10. DESCRIPCIÓN DE LESIÓN Y GENOTIPOS ENCONTRADOS
EN 2 PACIENTES CON INFECCIÓN POR
GENOTIPOS DE ALTO RIESGO (AR)

CASO	INTERPRETACIÓN FINAL	GENOTIPOS DE VPH IDENTIFICADOS	TIPO DE INFECCIÓN
1	CONDILOMA	16, 35	AR
2	NIC I	35, 52	AR

La distribución de genotipos en las 24 pacientes en las que se logro la identificación del genotipo de VPH , se muestra en la siguiente figura. Se puede observar que el genotipo aislado con mayor frecuencia fue el 6 (28 %), seguido del genotipo 4 (9.3%), un grupo que se presento con una frecuencia de 4.6%, donde se incluyen los genotipos 11,16,31,35,42,51,55 y otro donde la frecuencia de aislamiento fue 2.3 % que incluye a los genotipos 13,18,39,40,52,56,58,61,84. Es importante mencionar que el porcentaje de pacientes en las cuales no se logro la identificación de ninguno de los genotipos incluidos en el Kit empleado fue de 35.1%, lo cual es considerablemente alto. (FIGURA 5)

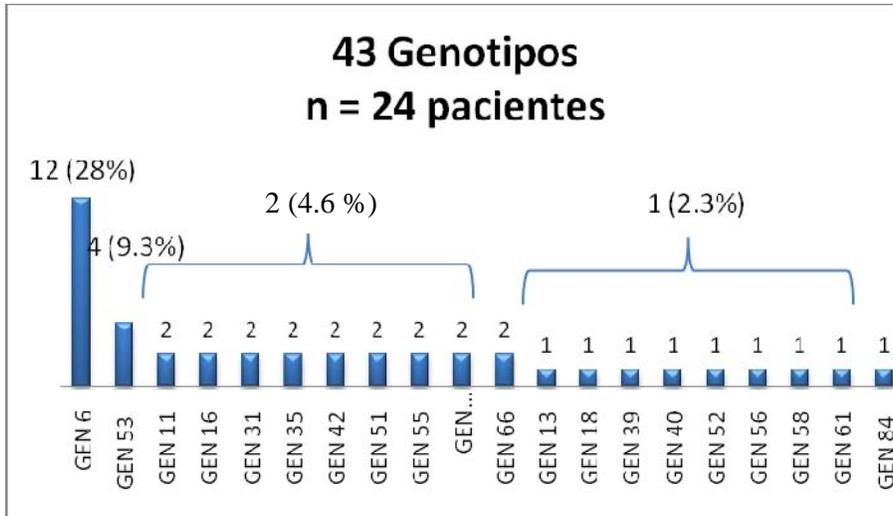


FIGURA 5. Genotipos identificados en 24 pacientes con VPH

Del total de 37 pacientes captadas, 4 pacientes fueron admitidas durante el segundo trimestre del embarazo (10.8 %) y 33 (89.2 %) durante el tercer trimestre del embarazo, de estas últimas 21 (56.8 %) llegaron con embarazo a termino entre las 38 y 40 SDG. (FIGURA 6) El promedio de SDG fue de 35.5%, la desviación estándar de 6.3 y la mediana de 38 SDG.

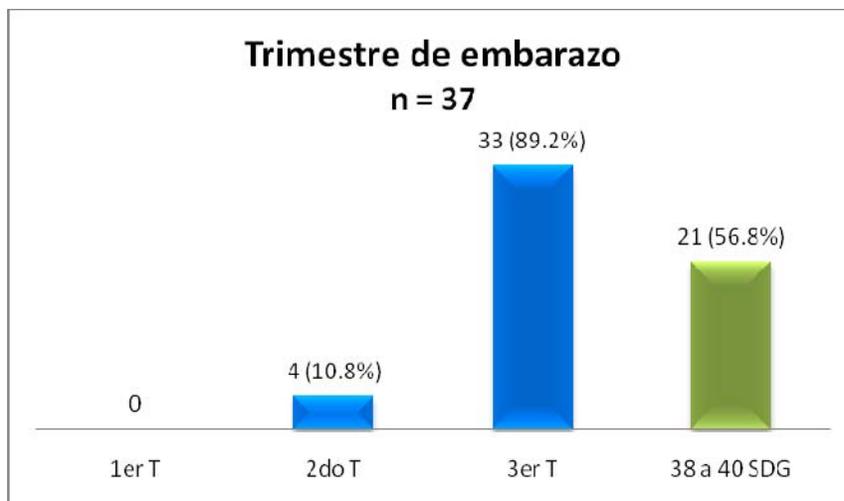


FIGURA 6. Clasificación de las pacientes de acuerdo al trimestre del embarazo en el cual se encontraban al momento del diagnostico de la infección por VPH.

Una vez obtenidos los resultados de los genotipos de VPH identificados durante el embarazo. Se realizó una revisión de los expedientes de las 37 pacientes incluidas en el estudio, de las cuales 31 (83.8 %) habían resuelto su embarazo vía cesárea y 6 (16.2 %) estaban embarazadas al momento de la revisión de expedientes. (FIGURA 7)

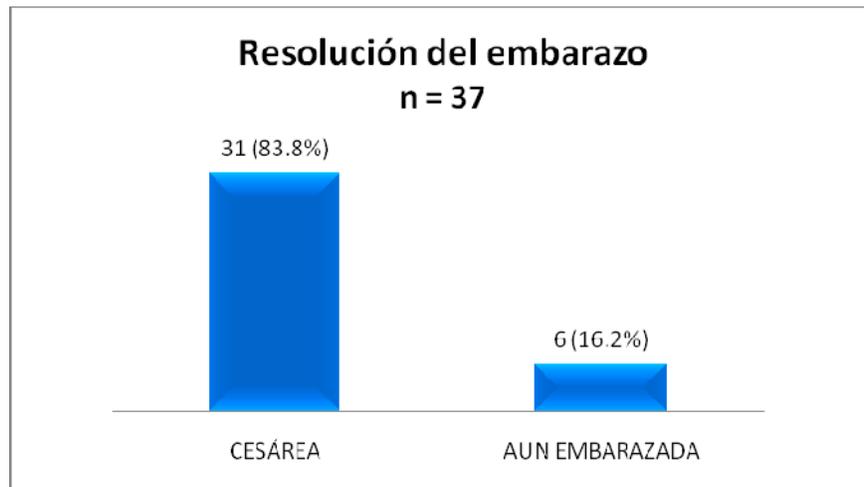


FIGURA 7. Condición fisiológica de las 37 pacientes obstétricas incluidas en el estudio

La edad de las pacientes varió de los 15 a 35 años, y se dividieron cuatro grupos, la mayor parte se incluyó en los grupos de 21 a 30 años 22 (59.5 %) y de 31 a 35 años con 8 (21.6 %), de las 7 pacientes englobadas en el rango de menores de 20 años, 6 (16.2 %) son menores de 18 años, es decir pacientes adolescentes embarazadas. El promedio de edad encontrado fue de 25 años, la desviación estándar fue de 5.8, se tiene una mediana de 25 y un intervalo de 15 a 35. (FIGURA 8)

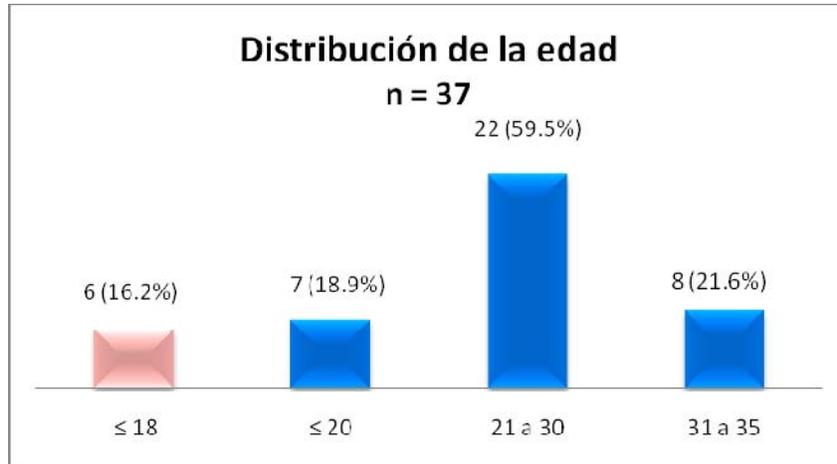


FIGURA 8. Distribución en grupos de edad de las 37 pacientes incluidas en el estudio.

Clasificándolas por IVSA se tiene que 28 pacientes iniciaron a edad menor de 20 años (75.7 %), 19 de ellas (51.4 %) pacientes, se incluyeron en el grupo de edad de 18 años o menos, mientras que en el grupo que se inicio sexualmente entre los 21 a 30 fueron 9 (24.3 %) pacientes. Se tuvo un promedio de 18.3, desviación estándar de 3.9 ,con una mediana de 17. e intervalo de 13 a 30. (FIGURA 9)

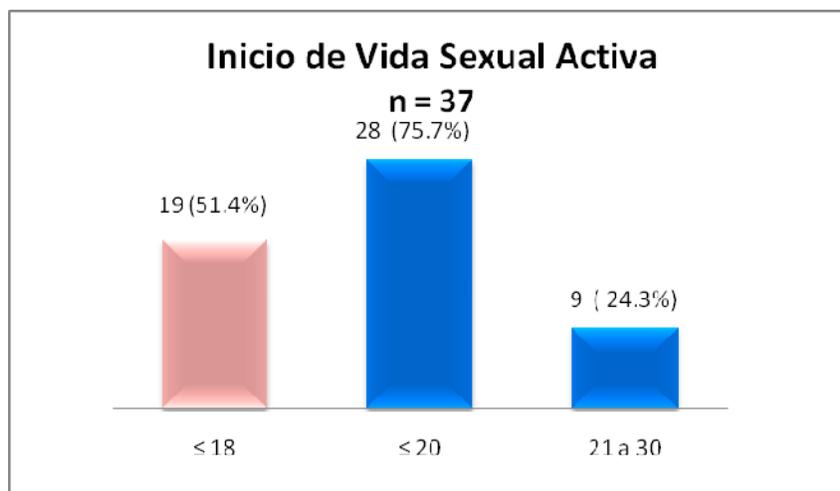


FIGURA 9. Edad de inicio de vida sexual, en las 37 pacientes incluidas en el estudio.

Analizando la información proporcionada del número de parejas sexuales, de las 37 pacientes incluidas en este estudio, 11(29.7 %) refirieron habían tenido una sola pareja sexual, y el mismo porcentaje se obtuvo para aquellas que refieren haber tenido dos parejas sexuales, 8(21.7 %) tres parejas sexuales y 7 (18.9 %) tienen un historial de más de tres parejas sexuales, en este grupo se logro identificar los casos de 3 pacientes (8.1%) que refieren haber tenido mas de 1° parejas sexuales. Obtuvimos un promedio de 3.5, con desviación estándar de 4.5, mediana de 2 y un intervalo de 1 a 20. (FIGURA 10)

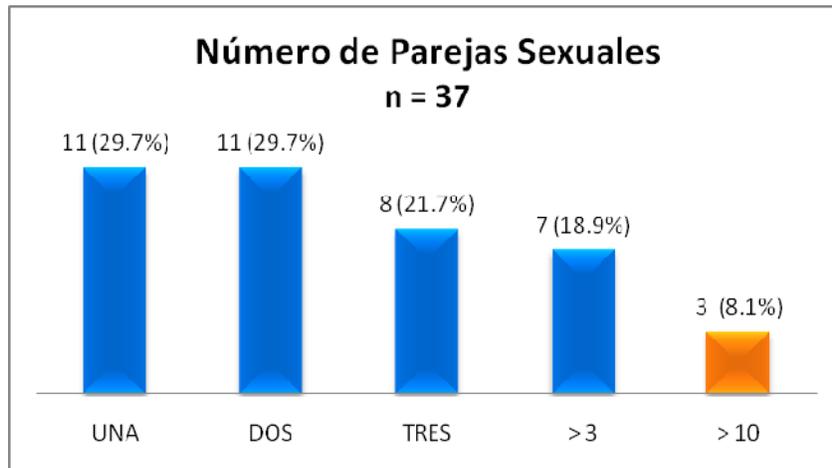


FIGURA 10. Número de parejas sexuales manifestado por las 37 pacientes Con infección por VPH.

Dentro del seguimiento que se les da a las pacientes, una vez establecido el diagnóstico de VPH, se incluye la toma de un exudado cérvicovaginal, con el fin de identificar si hay o no otras infecciones de transmisión sexual (ITS) asociadas a VPH. De estos estudios pudimos observar que 16 de las 37 (41.2%) pacientes desarrollaron en el cultivo gérmenes considerados parte de

la flora habitual de vagina, en 20 (54.1 %) mujeres se detectó únicamente un microorganismo patógeno y en 1 (2.2 %) se determinó la presencia de infecciones mixtas. (FIGURA 11)

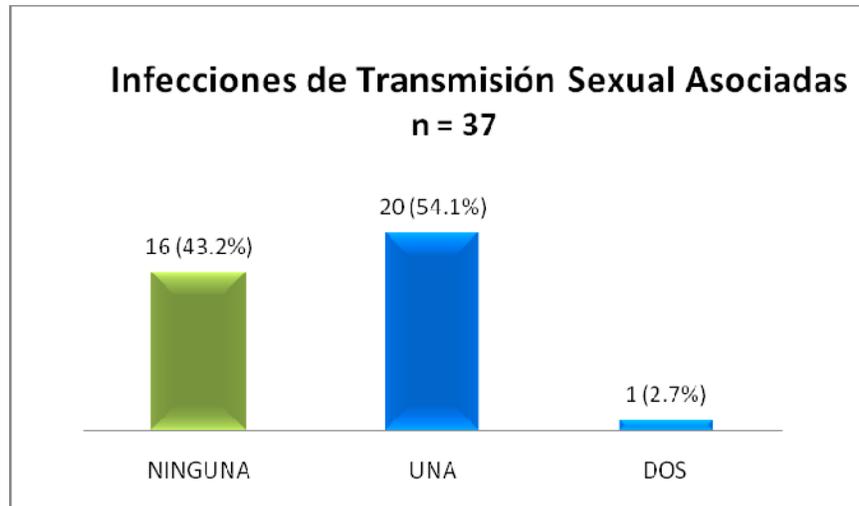


FIGURA 11. Distribución de los aislamientos de 37 cervicovaginales obtenidos de las pacientes estudiadas con infección por VPH.

Con relación a los antecedentes de ITS en las pacientes estudiadas, encontramos que 21 mujeres refirieron el haber cursado con una infección genital: una paciente presentó chlamidiosis, y en la misma proporción (4.6 %) se presentó infección por *Ureplasma*, 5 (22.7%) molusco contagioso, 7 (31.8 %) vaginosis bacteriana y 8 (36.3 %) candidiasis. (FIGURA 12)

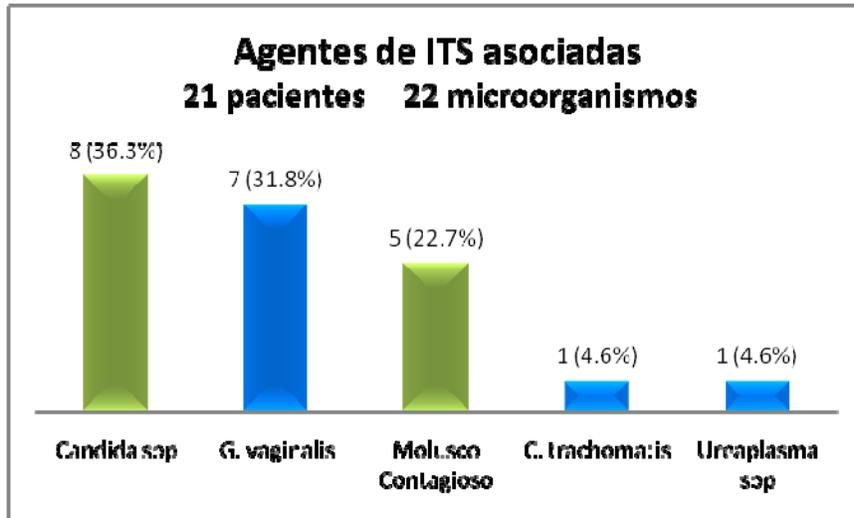


FIGURA 12. Distribución de infecciones de transmisión sexual detectadas en 21 pacientes con VPH

De las 37 pacientes incluidas en el estudio 3 no presentaron lesiones visibles durante la revisión, las 34 restantes se dividieron en 3 grupos de acuerdo a la localización de la lesión, la más frecuente fue la localización vaginal con 22 (61.8 %) pacientes dentro de este grupo, 7 (20.6%) con localización anal y 6 (17.6 %) de localización mixta. (FIGURA 13)

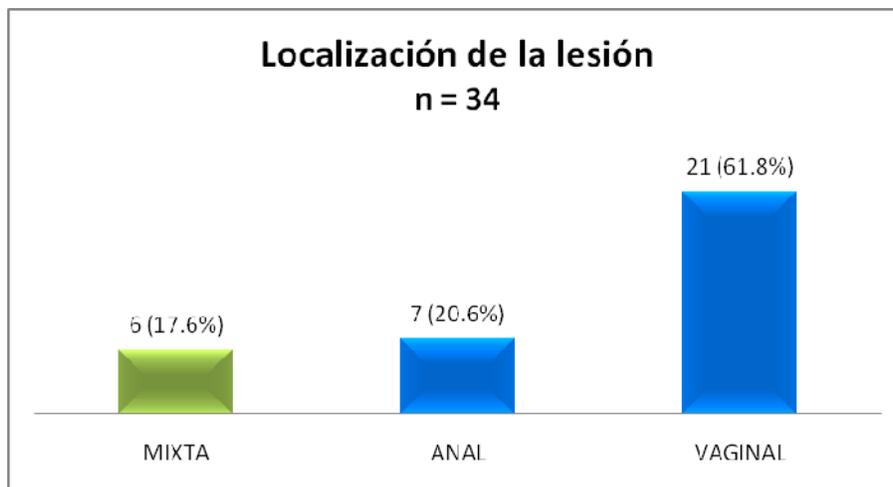


FIGURA 13. Localización de las lesiones detectadas en las pacientes incluidas en el estudio

En base a los resultados de patología se obtuvieron los siguientes datos: 32 (86.5 %) pacientes se clasificaron dentro del grupo de condilomas y 2 (5.4 %) pacientes con verrugas . En tres pacientes no se observaron lesiones. (FIGURA 14)

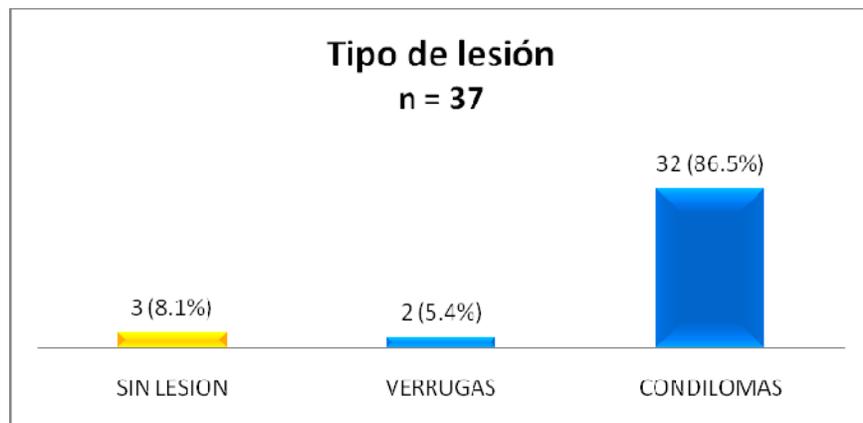


FIGURA 14. Distribución del tipo de lesión presente en las 37 pacientes estudiadas.

El grupo se dividió de acuerdo a la interpretación citológica de las lesiones presentes; 29 (78%) con condiloma, 2 (5.4%) pacientes dentro del grupo de LIEBG, 5 (13.5%) con NIC I , 1 (2.7%) pacientes con NIC III. (FIGURA 15)

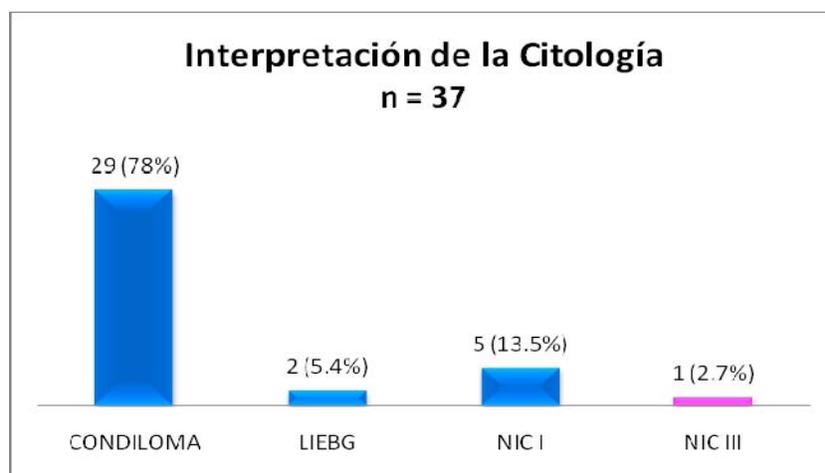


FIGURA 15. Interpretación citológica de las muestras de 37 pacientes con infección por VPH

8. DISCUSION

Las características clínicas, el aspecto histológico y la evolución natural de las enfermedades genitales asociadas con papiloma virus dependen en gran parte del genotipo presente, así se han clasificado las lesiones dependiendo del subgrupo en categorías que permiten hacer un seguimiento médico más oportuno y de mayor calidad ³¹.

En la mayoría de los casos las infecciones por VPH son subclínicas y es difícil detectarlas por examen citológico o histopatológico por esta razón los métodos moleculares como la PCR son recomendadas como tamizaje para identificación de los genotipos virales⁶⁸.

El propósito principal de este estudio fue determinar el (los) genotipos de VPH que se encuentran en mayor frecuencia durante la etapa gestacional. Se incluyó un grupo de 37 mujeres embarazadas en las cuales el genotipo más frecuente fue el 6 (28%), identificado en 12 pacientes, predominando en las lesiones de tipo condilomatosis vulvar y anal, así como el LIEBG, en algunas pacientes el asilamiento fue único y en otras estuvo en conjunto con genotipo de BR Y AR.

Otros genotipos encontrados en nuestra muestra fue el 11, 52 y 53 estos siempre se identificaron como tipo mixto y se relacionaron con lesiones condilomatosas vulgares, anales, LIEBG Y NIC I.

En nuestra muestra pudimos observar la identificación de genotipos de alto riesgo en combinaciones 6 y 39, 11 y 51, 16 y 51, 56 y 40. No tuvimos aislamientos oncogénicos de alto riesgo 16 y 18 como aislamientos únicos, solo los identificamos en infecciones mixtas y en lesiones de condilomas vaginal y anal.

Al compararlo con la literatura tuvimos resultados muy similares en relación a genotipos de BR como infecciones únicas que se relacionan a lesiones de bajo grado y con lesiones clínicas a nivel de vulva y ano, de igual forma pudimos observar la identificación de genotipos de AR Y BR que como se comenta en la literatura relacionadas a lesiones de bajo grado y NIC, los resultados de nuestra estudio muestra similitud con el estudio realizado por Constance y Col.,⁷⁰ en el cual se relaciona a los genotipos 6, 11 con lesiones genitales y permitió conocer la identificación de genotipos tanto de AR Y BR cuyas citologías en muchas ocasiones se reportan negativas.

Como caso especial podemos mencionar a las dos pacientes en las cuales la identificación de genotipos incluyo solo genotipos de alto riesgo altamente relacionados con el desarrollo de CaCu, las cuales son sumamente preocupantes debido a la condición gestacional, al respecto podemos mencionar algunos estudios como los realizados por Winer⁷¹ y Castellanos En donde se menciona que las mujeres embarazadas tiene riesgo mínimo de progresar a un cáncer invasor durante el embarazo, el reporte indica que solo

el 0.05% de las infecciones por genotipos de VPH de alto riesgo durante esta etapa están asociados con cáncer cervical.

Algunos factores de riesgo asociados a esta infección incluyen: Inicio precoz de actividad sexual, múltiples parejas sexuales, uso de anticonceptivos orales, tabaquismo, inmunocompromiso celular, promiscuidad relaciones sexuales sin preservativo, edad y presencia de otras enfermedades de transmisión sexual⁹.

Dentro de los factores de riesgo considerados en este estudio se analizaron los resultados obtenidos en la búsqueda de ITS en cada una de las pacientes incluidas en el estudio, se logró identificar algunos microorganismos que han sido mencionados en investigaciones anteriores (*Chlamydia trachomatis* y *Ureaplasma urealyticum*), como en el estudio realizado por Veteramo y Cols.⁴⁷ en el cual se analizaron muestras pacientes en los cuales se observó una asociación significativa de HPV con *Chlamydia trachomatis* y *Ureaplasma urealyticum*, no así con bacterias involucradas comúnmente con vaginosis bacteriana. Por lo que se puede considerar importante la evaluación simultánea de diversos microorganismos que pueden tener efectos patológicos sinérgicos con el VPH. que aun cuando en este estudio no fueron encontrados en alta frecuencia son importantes de mencionar.

De las pacientes en las que fueron identificadas genotipos, el predominio en cuanto a número de parejas sexuales fue de 2, y en relación a la edad de inicio

de vida sexual activa esta fue entre los 18 y 25 años de edad. Lo cual corresponde con lo relacionado en la literatura.

En cuanto a las muestras en las cuales no fue posible la identificación de alguno de los genotipos detectados por el Kit aun cuando se comprobó por PCR punto final la infección por VPH, nos atrevemos a suponer que tal vez pudiera tratarse de genotipos que no son tan frecuentes y /o no están incluidos en el Kit.

9. CONCLUSIONES

- Nuestros genotipos más frecuentes fueron 6 y 53.
- Se identificaron genotipos de alto riesgo en infecciones mixtas con citologías reportadas negativas y con lesiones vaginales en pacientes 16, 33, 39,51, 52,56.
- Predominaron genotipos de BR los cuales estuvieron asociados a cuadro clínico genital de la paciente y a lesiones de bajo grado y NIC.
- No correlacionamos genotipos de AR con lesiones de alto grado.

10. PERSPECTIVAS

- Continuar con el estudio tratando de obtener un tamaño de muestra mayor
- Enviar a secuenciar aquellas muestras en las que no fue posible la identificación de genotipos.
- Dar seguimiento a este tipo de pacientes buscando obtener muestras durante la gestación y después de ella para valorar la posibilidad de infecciones transitorias.

12. ANEXOS

A) CONSENTIMIENTO INFORMADO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) EN MUJERES EMBARAZADAS INFECTADAS DEL INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA “INPer”

Señora, por este medio se le invita a formar parte del proyecto de Investigación sobre el cuidado y tipo de atención que se debe de brindar a las embarazadas infectadas por el virus del papiloma humano (VPH), cuya participación consiste en que usted sea incluida en un grupo de atención médica en el cual además de un seguimiento más estrecho de su embarazo, se les realizarán diversos estudios, así como entrevistas y llenado de cuestionarios, tratando de identificar infección y estudiar el curso de esta durante el periodo gestacional.

El embarazo no está exento de lesiones malignas o premalignas del cuello del útero: por ello debe practicarse una citología como parte de su control prenatal. La citología cervical (Papanicolaou) es un método universal y sencillo que se emplea para identificar alteraciones celulares que indiquen el desarrollo de cáncer cervical. No hay contraindicación alguna para realizar una o más citologías durante el embarazo y es importante que usted sepa que el procedimiento no afecta al feto ni genera parto prematuro. La infección por el virus del VPH no afecta al feto ni la normal evolución de un embarazo si este es bien controlado.

Antes de que decida participar es importante que entienda porque se está realizando la investigación y en qué consiste esta. Tómese el tiempo necesario para decidir si desea o no participar, y discuta su participación con su familia y su médico si así lo desea. Este documento le proporciona información sobre el estudio. Lea este documento de solicitud de consentimiento informado con cuidado y haga cualquier pregunta que tenga sobre el estudio de manera de que usted pueda tomar una decisión informada acerca de su participación. Si después de leer y entender este documento decide participar se le pedirá que firme esta carta de consentimiento informado y se le entregará una copia de la misma.

Preguntas:

Consentimiento

Yo, _____ he leído la hoja de consentimiento informado que se me ha entregado. Mi participación en el proyecto es enteramente voluntaria y soy libre de rehusar a tomar parte o a abandonar en cualquier momento, sin afectar ni poner en peligro mi atención médica futura.

Consiento en participar en este proyecto, he tenido la oportunidad de plantear mis dudas, temores, expectativas respecto al estudio. Se me ha proporcionado información suficiente acerca de todo lo referente al estudio, han respondido todas mis preguntas y me han otorgado información complementaria del proyecto y me han dado tiempo para tomar mi decisión.

México D. F. a _____ de _____ del _____

Nombre y firma del paciente

Dirección _____

Teléfono _____

Nombre y firma de Testigo

Nombre y firma del Médico

Dirección _____

Teléfono _____

Nombre y firma de Testigo 2

B) CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN PARA PCR

Tabla 2. Condiciones de amplificación para los tres juegos de iniciadores

Juego de iniciadores	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión
MY 09/11	94 °C/30 s	55 °C/2 min	72 °C/1 min
GP5+/GP6+	94 °C/30 s	40 °C/2 min	72 °C/1 min
PCO4/GH20	94 °C/30 s	58 °C/1 min	72 °C/1 min

C) SECUENCIAS DE INICIADORES EMPLEADOS PARA LA DETECCIÓN DEL DNA DE VPH.

Tabla 3. Iniciadores empleados para la detección del DNA de VPH.

Juego de iniciadores	Región	Secuencia	Bases	Tm	Amplicón (pb)
MY 09/11	5´	CgTCCMARRggAWACTgATC	20	62	450
	3´	gCMCAgggWCATAAYAATgg	20	60	
GP5+/GP6+	5´	TTTgTTACTgTggTAgATACTA C	23	62	150
	3´	gAAAAATAAACTgTAAATCAT ATTC	25	60	
PCO4/GH 2	5´	CAACTTCATCCACgTTCACC	20	60	268
	3´	gAAgAgCCAAggACAaggTA	20	62	

D) FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA INFECCIÓN POR VPH EN LAS 37 PACIENTES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO

CASO	EDAD	IVSA	# PS	# GESTA	SDG A LA TOMA	ANT.G-O	VIA DE RESOLUCIÓN DE EMBARAZO	OTRAS INFECCIONES	DESCRIPCION DE LA LESIÓN	RESULTADOS DE PATOLOGÍA	INTERPRETACIÓN CLÍNICA	INTERPRETACIÓN DE PATOLOGIA	INTERPRETACIÓN FINAL	GENOTIPOS DE VPH IDENTIFICADOS			TRATAMIENTO
1	30	30	1	1	32	NO	CESAREA	NINGUNA	Condilomatosis vulvar, vaginal. Cervix tipo acuminado	NCM, AII, CM, ARI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	6	6108		ATCA
2	15	13	2	2	39	LESIONES INDURADAS NO DOLOROSAS	CESAREA	MOLUSCO CONTAGIOSO	Condilomatosis	NCM, AIG, CM, MRI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	6			ATCA
3	28	20	3	2	40	NO	CESAREA	MOLUSCO CONTAGIOSO	Condilomatosis Anal	NCM, AII, CM, ERI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	NO DETECTADO			ATCA
4	15	14	3	1	35	EUMENORREA	CESAREA	NINGUNA	Condiloma vulvar y cervical, lesiones en labio mayor izq.	NCM, AII, CM, MRI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	53	51	16	ATCA
5	27	21	2	3	36	NO	CESAREA	GARDNERELLA	Condiloma perianeal y vulvar (lesiones planas)	NCM, AIG, CM, MRI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	NO DETECTADO			ATCA
6	28	19	1	1	22	NO	AÚN EMBARAZADA	NINGUNA	No se describen lesiones	LEIBG, DISPLASIA MODERADA, NCM	SIN LESION	LEIBG	LEIBG	NO DETECTADO			CONIZACIÓN
7	21	16	2	3	36	NO	CESAREA	NINGUNA	Condiloma vulvar plano espiculado	LEIEBG EXPRESION VPH NIC1	CONDILOMA	NIC I	NIC I	11	66		ATCA
8	21	17	3	2	38	NO	CESAREA	NINGUNA	Condiloma vulvar, lesiones en labio mayor izq.	NCM, AII, CM, MRI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	53			ATCA
9	25	23	3	2	40	NO	CESAREA	CANDIDA	Condilomas anales	NCM, AII, CM, ERI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	NO DETECTADO			ATCA
10	34	30	1	1	17	NO	AÚN EMBARAZADA	NINGUNA	No se describen lesiones	NIC 1	SIN LESION	NIC I	NIC I	35	52		CONIZACIÓN
11	16	16	4	1	40	NO	CESAREA	GARDNERELLA	Condiloma perianeal	NCM, AIG, CM, MRI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	NO DETECTADO			ATCA
12	21	15	2	1	40	NO	CESAREA	GARDNERELLA	Condiloma vulvar	NCM, AII, CM, MRI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	6	39		ATCA
13	33	23	1	2	38	NO	CESAREA	CANDIDA	Verrugas acuminadas en labio derecho y perianal	NCM, Almonillas, CM ARI	VERRUGAS	NEGATIVA	CONDILOMA	6			ATCA
14	19	16	4	1	39	NO	CESAREA	CANDIDA	Condiloma vulvar y Molusco contagioso	LIEBG, NIC1	CONDILOMA	NICI	NIC I	11	51	31 Y 42	ATCA
15	26	16	2	4	38	NO	CESAREA	NINGUNA	Condiloma vulvar y anal	NCM, AII, CM, MRI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	NO DETECTADO			ATCA
16	31	18	2	3	37	NO	CESAREA	CHLAMYDIA	No se describen lesiones	LEIBG, ARI	SIN LESION	NIC III	NIC III	NO DETECTADO			CONIZACIÓN
17	18	15	3	1	38	NO	CESAREA	GARDNERELLA	Condiloma verrucosa exofítica en labios mayores y perianal	NCM, AII, CM, MRI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	6			ATCA
18	25	24	1	2	37	NO	CESAREA	GARDNERELLA	Condiloma verrucoso vulvar, vaginal y cervical	NCM, AII, CM, MRI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	40	56		ATCA
19	21	15	15	1	39	NO	CESAREA	NINGUNA	Condiloma verrucoso acuminado perianal	NCM, AII, CM, MRI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	NO DETECTADO			ATCA
20	24	19	2	4	30	NO	CESAREA	GARDNERELLA	Condiloma vulvar perianal	LIEBG, NIC1	CONDILOMA	NIC I	NIC I	53			
21	26	15	1	5	39	NO	CESAREA	CANDIDA	Condiloma verrucosa exofítica en labio menor y horquilla	LIEBG EXPRESION VPH	CONDILOMA	LEIBG	LEIBG	6			74

CASO	EDAD	IVSA	# PS	# GESTA	SDG A LA TOMA	ANT.G-O	VIA DE RESOLUCIÓN DE EMBARAZO	OTRAS INFECCIONES	DESCRIPCION DE LA LESIÓN	RESULTADOS DE PATOLOGÍA	INTERPRETACIÓN CLÍNICA	INTERPRETACIÓN DE PATOLOGÍA	INTERPRETACIÓN FINAL	GENOTIPOS DE VPH IDENTIFICADOS			TRATAMIENTO
22	17	17	1	1	22	NO	AÚN EMBARAZADA	UREAPLASMA	Condiloma vulvar y anal	LIEBG EXPRESION VPH NIC1	CONDILOMA	NIC I	NIC I	6	55		ATCA
23	31	22	4	2	37	NO	CESAREA	NINGUNA	Condiloma verucosa exofitica en labios menor	NCM, AII, CM, ARI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	NO DETECTADO			ATCA
24	21	16	1	1	38	Preeclamsia Leve	CESAREA	NINGUNA	Condilomatosis labio mayor izquierdo, labio menor derecho, ingle derecha	NCM, AII	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	55			ATCA
25	30	16	2	3	40	NO	CESAREA	NINGUNA	Condiloma verucosa en vulva	NCM, AII, CM, MRI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	61			ATCA
26	24	14	20	2	40	NO	CESAREA	MOLUSCO CONTAGIOSO	Condiloma perianeal	NCM, AII, CM, MRI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	35	16		ATCA
27	24	18	1	4	15	NO	AÚN EMBARAZADA	NINGUNA	condiloma vulvar	NCM, AII, CM, ERI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	NO DETECTADO			ATCA
28	22	18	2	2	39	NO	CESAREA	NINGUNA	Condiloma vulvar	NCM, AII, CM, ERI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	NO DETECTADO			ELECTROCIRUGIA
29	35	20	1	1	38	NO	CESAREA	NINGUNA	condiloma exofitico vulvar	NCM, Ep. Vag. Sin alteraciones	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	6	6108		ATCA
30	26	22	2	1	30	NO	CESAREA	CANDIDA	condiloma vulvar exifiticos	Cel. Guia	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	6	53		ATCA
31	34	15	3	1	38	NO	CESAREA	CANDIDA	condilomas acuminados en perine	NCM, Almonillas, CM ARI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	NO DETECTADO			ATCA
32	15	14	1	1	39	NO	CESAREA	NINGUNA	Condiloma vulvar y anal	NCM, AIG, CM, ERI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	6	52	58 Y 66	ATCA
33	35	17	6	3	39	NO	CESAREA	CANDIDA	condiloma vulvar exifiticos	NCM, AII, CM, MRI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	13			ATCA
34	24	17	2	3	37	NO	AÚN EMBARAZADA	CANDIDA	Condiloma vulvar	NCM, AIG, CM, ERI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	6			ATCA
35	26	18	20	1	39	NO	AÚN EMBARAZADA	NINGUNA	Lesiones verrucosas en perine	NCM, AIG, CM, ERI	VERRUGAS	NEGATIVA	CONDILOMA	31	42	84	ATCA
36	32	19	3	3	37	FIBROSIS	CESAREA	MOLUSCO CONTAGIOSO	condilomas region perianal y muslo interno.	NCM, AII, CM, ARI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	NO DETECTADO			ATCA
37	27	21	3	1	37	NO	CESAREA	GARDNERELLA	condiloma vulva-perineal acuminados	NCM, AIG, CM, ERI	CONDILOMA	NEGATIVA	CONDILOMA	6	18		ATCA

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Zur-Hausen H. Papillomavirus infections a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996;1288:F55-78.
2. Aranda Flores Carlos MAG, Arteaga Gómez Ana C.: Virus del papiloma humano. México: Alfil; 2004.
3. Woodman CBJ CS, Young LS. . The natural history of cervical HPV infection: Unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 2007;7:11-22.
4. Kumar. Pathologic Basis of Disease. In: Neoplasia de tracto genital. Professional Edition, 8th ed ed: Kumar.
5. Intraepithelial Neoplasia of the Lower Genital Tract. . Chapter 28. (Accessed at
6. Human Papillomaviruses. (Accessed (12.011.09 17:35), at
7. Bonezz W RR. Papilomavirus. 6ta edición. ed. España,,: Elsevier,; 2006.
8. consenso de papilomavirus.
9. Premoli G GA, Villareal J, Aguilera L. . Virus del papiloma humano visión actual en biomedicina. *ADM* 2005;52:213-24.
10. Muñoz N BF, de Sanjose S, et al. . Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;384:518-27.
11. Insinga RP DE, Elbasha E. . Epidemiologic natural history and clinical management of human papillomavirus (HPV) disease: a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model. *BMC Infect Dis* 2009;9:119-44.
12. Castle PE SM, Gravitt PE, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2000;38:357-61.
13. Vermud SH MB. Papillomavirus infections. En Cohen & Powderly: Infectious Diseases 2da Edicion , MOSY 2004:827-35.
14. Novoa Vargas A EGA. Epidemiologia del Cancer de Cervix en Latinoamerica. *Ginecol Obstret Mex* 2001;69:243-6.
15. Rivera R DJ, Painel V, Barrero R, Larrain A. . Mecanismos de infección y transformación neoplásicas producido por el virus del papiloma humano en el epitelio cervical. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2006; 71(2):135-9.
16. Sánchez J HM, Rivera J, Rosales M. . Infección por virus del VPH y cáncer cérvico uterino. *Rev Méx Patol Clin* 2005;52:222-33.
17. Toledo-Cuevas EM G-CA. p53 protein and human papillomavirus oncogenes in carcinogenesis of the uterine cervix. *Rev Inv Clin* 1996;48:59-68.
18. Castlellsagué X dSS, Aguado T, Louie KS, Bruni L, Muñoz J, Diaz M, Irwin K, Gacic M, Beauvais O, Albero G, Ferrer E, Byrne S, Bosch FX HPV and Cervical Cancer in the World 2007 Report. The Official Journal of the International Society for Vaccines, . The Official Journal of the Japanese Society for Vaccinology 2007;25:issn 0264-410x.
19. Casanova G.. México A. Infecciones por virus del papiloma humano. In: Casanova G OF, Reyna J, ed. Infecciones de transmisión sexual. 1ª. Edición ed: Alfil; 2004:49-68.
20. Ponce. S. Cáncer de cérvix. ¿Enfermedad oncológica o enfermedad infecciosa? *Prog Obstet Ginecol* 2001;44:285-323.
21. Winer R KL, Hugues J, Adan D, Kiviat N, Koutsky L. . . Genital Human pipillomavirus infection: Incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol* 2003 157 (3):218-26.
22. Montoya R RM, Moran M, Gallegos A, Flores M, Sánchez C. Detección de papilomavirus humano tipos 16, 18, 35 y 58 en cáncer cervicouterino y lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado en el occidente de México: correlación clínico-molecular. *Ginecol Obstret Méx* 2001;69 (4):137-42.

23. Herrera H RP. El virus del papiloma humano y su relación con la neoplasia cervical humana. *Rev Esp Patol* 2002;3:51-62.
24. Wright T SL, Dunton C, Spitzer M, Wilkinson E, Salomon D. . 2006 Consensus guidelines for the Management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. *J low Genit Tract Dis* 2007;11(4): 223-39.
25. Monsonogo J PG, Evrard MJ, et al. . Detection of human papillomavirus genotypes among high-risk women: A comparison of hybrid capture and linear array tests. *Sex Trans Dis* 2008; 35:521-7.
26. Castellanos M. El virus del papiloma humano y el cáncer cervicouterino. . *Rev Fac Med UNAM* 2004; 47 (1):35-6.
27. Muñoz N BX. Cervical cáncer and human papillomavirus epidemiological evidence and perspectivas for prevention. *Salud Pública Méx* 1997;39:274-81.
28. Rakel. Human Papillomavirus. In: *Integrative Medicine*,. 2nd ed. ed.
29. World Health Organization ICdO. HPV Information Centre Summary Report Update “Human Papillomavirus and Related Cancers”. 2009. México.
30. Flores YN BD, Shah KV, Lazcano Ponce E, Lörinez A, et al. . Risk Factors for Cervical Cancer Among HPV Positive Women In Mexico. *Salud Publica de México* 2008;50:49-58.
31. Mendoza JA MM, Vielma S, Noguera MA, López M, et al. Infección Cervical por el Virus del Papiloma Humano: Diagnostico por Citología y por Captura de Híbridos del ADN Viral. . *Rev Obstet Ginecol Venez* 2000;60:103-7.
32. Smith EM WD, Rubenstein LM, et al. Association between p53 and human papillomavirus in head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:421-7.
33. Rivera ZR DD, Painel PV, Barrero PR, Larrain HA. . Mecanismo de Infección y Transformación Neoplasica producido por Virus de Papiloma Humano en el Epitelio Cervical. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2006;7:135-40.
34. Cañadas MP LB, Lorinez A, et al. . Evaluación de las técnicas de detección del VPH en los programas de cribado para cáncer de cuello uterino. *Salud Publica Mex* 2006;48:373-8.
35. Syrjänen S PM. Human papillomavirus infections in children: the potential role of maternal transmission. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11:259-74.
36. Sarkola ME GS, Rintala MA, et al. . Human papillomavirus in the placenta and umbilical cord blood. . *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008;87:1181-8.
37. Castellsagué X DT, Cañadas MP, et al. . . Human Papillomavirus (HPV) infection in pregnant women and mother-to-child transmission of genital HPV genotypes: a prospective study in Spain. *BMC Infect Dis* 2009;9:74-86.
38. Ruffin IV M BJ, Roulston D, et al. Human papillomavirus in amniotic fluid. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2006;6:28-31.
39. Watts DH KL, Holmes KK, et al. Low risk of perinatal transmission of human papillomavirus: results from a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:365-73.
40. Fredericks BD BA, Daniel HW, et al. . Transmission of human papillomaviruses from mother to child. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1993; 33:30-2.
41. Rintala M GS, Puranen M, et al. . Natural history of oral papillomavirus infections in spouses: a prospective finnish HPV family study. *J Clin Virol* 2006;35:889-94.
42. Rombaldi RL SE, Mandelli J, et al. . Perinatal transmission of human papilomavirus DNA. *Virol J* 2009;6:83-95.
43. Silverberg MJ TP, Lindeberg H, et al. . Condyloma in pregnancy is strongly predictive of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Obstet Gynecol* 2003;101:645-52.
44. Melo AA GM, Capurro VI, Guzman GP, Brebi MP, et al. . Genotipificación del Virus de Papiloma Humano en Mujeres con Adenocarcinoma Cervical de la Region de la Araucania-Chile. *Rev Chil Infect* 2010;27 297-301.
45. Hubbard R. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:940-5.

46. Sandri MT RD, Salvatici M, et al. . Typing of human papillomavirus in women with cervical lesions: Prevalence and distribution of different genotypes. *J Med Virol* 2009;81:271-7. .
47. Veteramo R PA, Mancini E, Calzolari E, Bucci M, et. al. . Human Papillomaviruses and Genital Co-Infections in Gynaecological Outpatients. *BMC Infectious Diseases* 2009;9 1-7.
48. Mao C HJ, Kiviat N, Kuypers J, Lee Sk, et al. . Clinical Findings Among Young Women With Genital Human Papillomavirus Infection. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:677-84.
49. Hernandez Colin V ACF, Toraño Zamudio V, Sandoval Jurado L, Ceballos Martinez Z. . Identificación de Mecanismos de Transmision del Virus del Papiloma Humano en Mujeres Infectadas. *Rev Enferm IMSS* 2006;14 75-9.
50. Toroella K. HPV prevalence among mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecol Oncol* 1998;70:115-20.
51. Nobbenhuis M BV, Rosendal L. .. Primary screening for high risk HPV by home obtained cervicovaginal lavage is an alternative screening tool for unscreened women. *J Clin Path* 2000; 55:435-39.
52. Coloma F TJ, Lloret A, Diago J, Costa S, Rodenas J, Gilabert M. . Seguimiento de las pacientes con SIL. *Rev Esp Ginecol Obstet* 2003;23:57-64.
53. Ramírez J DM, Yerena C, Ortiz R, . , (); . Prevalencia del virus de papiloma humano de alto riesgo tpo 52 y 66, en muestras endocervicales de población clínicamente sana con Papanicolaou normal, de la ciudad de Xalapa, Ver., México. *Rev Fac Med UNAM* 2009;34:94-101.
54. Puig-Tintore. L. La infección por papilomavirus. In; 2002:40-1.
55. Bosch F. Epidemiología de las infecciones por el virus del papiloma humano: nuevas opciones para la prevención del cáncer cervicouterino. In: Hernández AM LP, Alonso RP (eds), ed. *Cáncer cervicouterino Diagnóstico, prevención y control*. México: Médica Panamericana; 2005:203-18.
56. Salomon D DD, Kurman R, O'connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, et al. . Bethesda system. *JAMA* 2002;287:14-9.
57. Mosiki. L. VPH y la mujer adolescente. *HPV today* 2004;5:41-5.
58. Hernandez-Girón C SJ, Lorincz A, et al. The prevalence of high-risk HPV infection in pregnant women from Morelos, México. *Salud Publica Mex* 2005;47:423-9.
59. Hernández C SJ, Lorincz A, Lazcano E, Hernández M, Salmerón J. 2005; 32(10): 613-618. High risk papillomavirus detection and related risk factors among pregnant an nonpregnant women in México. . *Sex Trans Dis* 2005;32:613-8.
60. Rombaldi RL SE, Mandelli J, et al. Transplacental transmission of human papillomavirus. *Virol J* 2008;5:116-30.
61. García Carrancá A BCJ, Jiménez Flores R, Escobedo García A, Cruz Alviter O. Utilidad de las técnicas de biología molecular en el virus del papiloma humano. *GAMO* 2006;5:109-10.
62. Kendall H FS, Dong H, et al. . Comparisons of HPV DNA detection by MY09/11 PCR methods. *J Med Virol* 2002;68:417-23.
63. Negri G RB, Egarter E, Mian C. Human papillomavirus typing with hybrid capture II on archived liquid-based cytologic specimens. *Am J Clin Pathol* 2004;122:90-3.
64. Carrillo A MA, Meneses A, Frias M, Solorza G, Lizano M. . Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. *Salud Publica Méx* 2004;46:1-7.
65. Soler M BP. New technologies in cervical cáncer precursor detection. *Curr Opin Oncol* 2000;12:469-5.
66. Curiel J LR, Berumen J, Briones J, Catarino A. . Detección citológica de virus del papiloma humano y su correlación con PCR. *Rev Mex Patol* 1999;46:74-8.
67. Sota M. Técnicas para la determinación del VPH. *Microbiología Molecular* 2003;11:39-49.
68. Melo A MS, Hooper T, Capurro I, Roa I. . Tipificación del virus del papiloma humano en lesiones preneoplásicas y ccarcinoma en Chile. *Rev Med Chil* 2003;131:1382-90.
69. Lacruz C DMB, Alvarez E. Incidencia de los diferentes tipos de papiloma virus humano (HPV) en las lesiones escamosas del cérvix. *Rev Esp Patol* 2003;36:79-84.

70. Constance M HJ, Kiviat N, Kuypers J, Lee Shu , Adam D, et. al. Clinical findings among young women with genital human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:677-84.
71. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, et al. Detection of genital HPV types in fingertip samples from newly sexually active female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:1682-5.