

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



“TIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN UN GRUPO DE MUJERES JÓVENES CON DIAGNÓSTICO DE CARCINOMA CERVICAL INVASOR”

POR:

DR. RODOLFO FRANCO MÁRQUEZ

COMO REQUISITO PARA OBTENER

EL GRADO DE

ESPECIALISTA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA

FEBRERO 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Hospital universitario

"Dr. José Eleuterio González"



Servicio de anatomía patológica y citología

Tesis como requisito para del grado de especialista en anatomía patológica

"TIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN UN GRUPO DE MUJERES JÓVENES CON DIAGNÓSTICO DE CARCINOMA CERVICAL INVASOR"

PRESENTADO POR:


DR. RODOLFO FRANCO MÁRQUEZ


DIRECTOR DE TESIS

DR. MED. ORALIA BARBOZA QUINTANA


CO-DIRECTOR DE TESIS

DRA. GABRIELA SOFÍA GÓMEZ MACÍAS

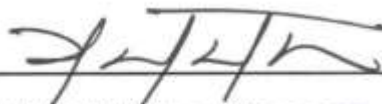
Aprobación de la tesis:



Dr. Med. Oralia Barboza Quintana
Director de tesis




Dra. Gabriela Sofía Gómez Macías
Co-director de tesis



Dra. Natalia Vilches Cisneros
Coordinador de enseñanza



Dr. Med. Oralia Barboza Quintana
Jefe del servicio de anatomía patológica y Citopatología



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martinez
Subdirector de estudios de posgrado

"Tipificación del virus de papiloma humano en un grupo de mujeres jóvenes con diagnóstico de carcinoma cervical invasor"

Presentado por

Dr. Rodolfo Franco Márquez

Este trabajo se realizó en el servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del hospital universitario "Dr. José Eeluterio González" bajo la dirección de la Dra. med. Oralia Barboza Quintana y la codirección de la Dra. Gabriela Sofía Gómez Macías



Dr. med. Oralia Barboza Quintana

Jefe del servicio de Anatomía Patológica y Citopatología

Agradecimientos:

A la Dra. Oralia Barboza quien dirigió personalmente esta tesis y se mantuvo al tanto del progreso, por su esfuerzo y trabajo en la misma además de su apoyo incondicional también a la Dra. Raquel Garza por su confianza y la oportunidad de ingresar en esta institución; por su apoyo y guía en mi formación.

A la Dra. Gabriela Sofía Gómez por su participación en esta tesis y por todas sus enseñanzas y consejos

A mi amada esposa Flor Nataly Viramontes por su apoyo infinito, paciencia, comprensión, compañía, amor y motivación para mi superación

Al Dr. Marco Ponce por todas sus enseñanzas, motivación y apoyo el día a día de mi formación como anatomopatólogo.

A mis padres y abuelos por guiar mi formación como ser humano, por su amor, guía, regaños, confianza y valores inculcados que me convirtieron en lo que hoy soy y en lo que sueño conseguir

A mis compañeros residentes; David, Laura, Nanis, Abelardo, Melissa, Karla, Luis Carlos, Eric, Adriana, Lucia, Eduardo, Hersilia, Bárbara, Eirali, Elizabeth, Arturo, Mauricio, Melissa y Daniel con quienes compartí esta gran etapa, gracias por su amistad, cariño y confianza, por ser parte de este periodo de formación que recorrimos juntos

A todos mis profesores del servicio de Anatomía patológica y Citopatología, quienes me guiaron y me brindaron las bases del conocimiento de la anatomía patológica, al Dr. Luis Ángel Ceceñas Falcón, el Dr. Álvaro Barbosa Quintana, la Dra. Natalia Vilches Cisneros, al Dr. Juan Pablo Flores Gutiérrez, a la Dra. Ivett c. Miranda Maldonado, a la Dra. Gabriela Alarcón Galván y a la Dra. Yuridia Alvarado Bernal.

Finalmente a todas aquellas personas que a lo largo de mi carrera contribuyeron en mi formación, a todo el personal del servicio de Anatomía Patológica, las secretarias y técnicos que se convirtieron de compañeros a amigos y a cada persona que me acompañó en este recorrido

Capítulo I	
1. RESUMEN.....	Pg-6
Capítulo II	
2. MARCO TEORICO.....	Pg-7
Capitulo III	
3. JUSTIFICACIÓN.....	Pg-15
Capitulo IV	
4. HIPOTESIS.....	Pg-16
Capítulo V	
5. OBJETIVOS.....	Pg-16
Capítulo VI	
6. MATERIAL Y METODOS.....	Pg-17
Capítulo VII	
7. RESULTADOS.....	Pg-24
Capítulo VIII	
8. DISCUSION.....	Pg-29
Capítulo IX	
9. CONCLUSIÓN.....	Pg-35
Capítulo X	
10. BILBLIOGRAFIA.....	Pg-36

Capítulo I

1.- RESUMEN

Rodolfo Franco Márquez.

Fecha de graduación: Febrero 2017

Universidad Autónoma de Nuevo León.

Facultad de Medicina.

Título del estudio: Tipificación del virus de papiloma humano en un grupo de mujeres jóvenes con diagnóstico de carcinoma cervical invasor.

Número de páginas: 41.

Requisito para obtener el grado de especialista en anatomía patológica.

Área de estudio: Anatomía Patológica.

Propósito y método de estudio: El carcinoma cervicouterino (CACU) es la neoplasia maligna más común del tracto genital femenino, y representa la segunda neoplasia maligna ginecológica a nivel mundial. Los virus del papiloma humano (VPH) son un grupo de virus ADN con tropismo cutáneo y mucoso. Casi todos (99,8%) los casos CACU se deben a tipos específicos de VPH. En nuestro medio no se ha dado a conocer la distribución real de los tipos de alto y bajo riesgo y si alguno de ellos se asocia a carcinoma invasor en pacientes menores de 40 años, tampoco se conoce la infección concurrente de más de un tipo de VPH, debido a esto el conocer la distribución en nuestra población de los tipos de VPH de alto riesgo en mujeres jóvenes con lesiones invasoras podría ser relevante para el abordaje terapéutico, pronóstico. En nuestro estudio analizamos 51 casos de CACU invasor en mujeres menores de 40 años y se estudió la presencia de los tipos de virus de papiloma humano por microarreglos.

Contribuciones y conclusiones: Se encontró VPH 16, 56 y 18 en 66.88% de los CACU invasor. Una vacuna profiláctica anti VPH 16 y 18 serían, teóricamente, útil en la prevención de lesiones causadas por estos tipos de VPH. Sin embargo, el beneficio potencial de la vacuna podría ser heterogéneo a lo largo de la región y el tiempo en caso de que la prevalencia en solitario o en co-infección del subtipo 56 sea relevante.

Tipificación del virus de papiloma humano en un grupo de mujeres jóvenes con diagnóstico de carcinoma cervical invasor

Capítulo II

2.-Marco teórico.

Introducción:

El carcinoma cervicouterino (CACU) es la neoplasia maligna más común del tracto genital femenino, y representa la segunda neoplasia maligna ginecológica a nivel mundial¹. La mayoría de los casos ocurren en países en vías de desarrollo en donde es la causa líder de mortalidad en mujeres. En los países desarrollados la incidencia del carcinoma escamoso ha ido en descenso por un tiempo, sin embargo la del adenocarcinoma ha ido en aumento².

El CACU es poco común en países desarrollados y los casos son aún más raros en pacientes jóvenes con un promedio de 14 carcinomas por año en pacientes entre los 15-19 años de edad y 125 carcinomas por año en pacientes entre los 20-24 años de edad³.

En México, en el año 2002, se presentaron 12,512 nuevos casos de CACU, de los cuales 5 777 (el 46% de los casos), fueron decesos, La mortalidad por cáncer cervicouterino en México se estima de 21.8 de cada 100,000 mujeres⁴. Esta entidad fue la primera causa de muerte por cáncer entre las mujeres mexicanas, ocupando un 16.6% (Figura 1). La mayoría de las mujeres que desarrollan carcinoma cervical tienen entre 40 y 50 años de edad sin embargo cada vez es más frecuente ver mujeres jóvenes infectadas por VPH y diagnosticadas con cáncer cervicouterino entre los 20-30 años.⁵⁻¹

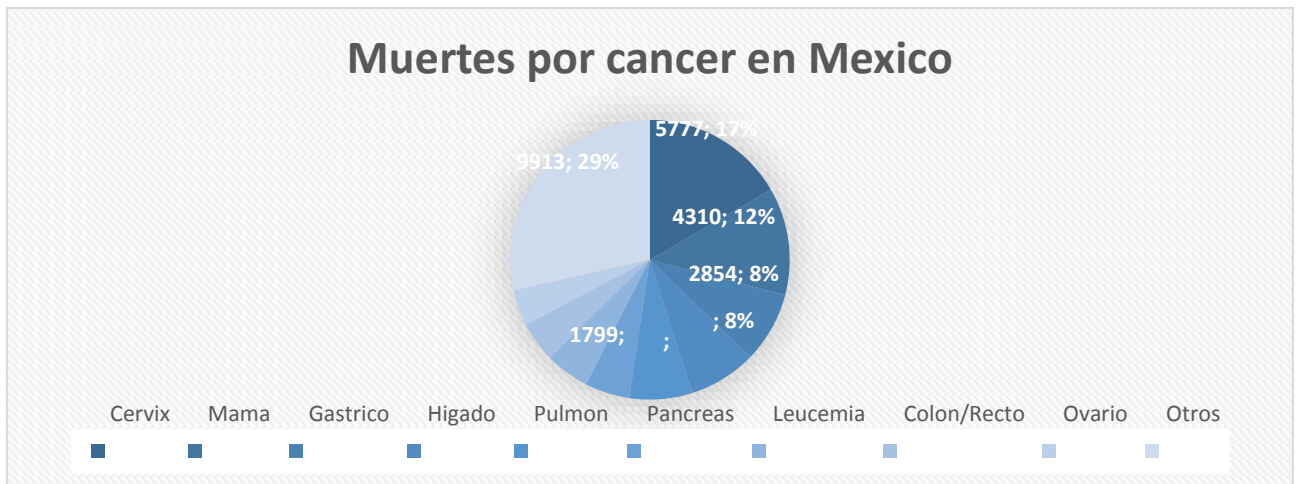


Figura 1

VPH

El virus del papiloma (VP) pertenece a la familia Papillomaviridae, una familia recientemente reconocida como distinta de los polyomavirus por el Consejo Internacional para la Taxonomía de los Virus. Estos virus están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Infeccionan específicamente el epitelio escamoso de más de 20 especies diferentes de mamíferos, así como aves y reptiles. La partícula viral del papiloma humano tiene una cápside de 72 capsómeros con un diámetro aproximado de 55 nm y que contiene al genoma viral (Figura 1). Los capsómeros están hechos de dos proteínas estructurales: L1 en mayor proporción y L2. El VPH es relativamente estable y debido a que no tiene una envoltura, permanece infeccioso en un ambiente húmedo por meses.⁵⁻⁶⁻⁷⁻⁸. El genoma del VPH consiste de una molécula de DNA circular de doble cadena, aproximadamente de 8 Kb. Se divide en tres regiones: la región larga de control (LCR) que no contiene marco de lectura alguno; la región que corresponde a las proteínas tempranas (E1 a E8) y la región que corresponde a las proteínas tardías (L1 y L2)⁵⁻⁶(Figura 3).

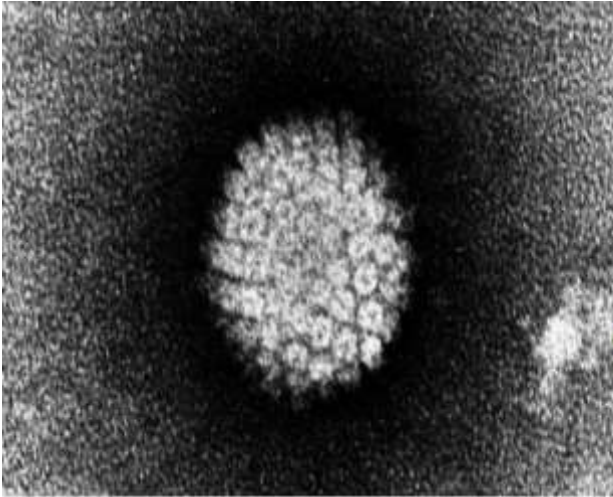


Figura 2

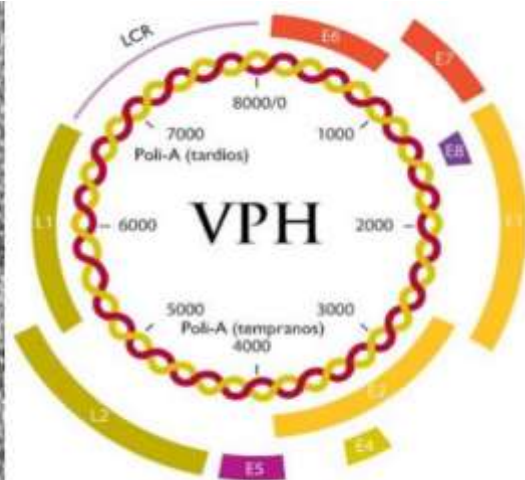


Figura 3

Nomenclatura y clasificación del virus del papiloma humano

El gen L1 es el más conservado del genoma viral y por tanto ha sido usado para identificar nuevos tipos virales. Un nuevo tipo viral es reconocido como tal solo si la secuencia nucleotídica del gen L1 difiere por poco más del 10% de aquella del tipo viral conocido más cercano. Diferencias de 2 a 10% definen a un subtipo viral, mientras que la diferencia menor a 2% define a una variante viral. Hasta la fecha se han descrito y secuenciado completamente 118 tipos virales. Los VP se clasifican en 3 niveles taxonómicos: Género, Especie y Tipo. Los diferentes géneros comparten menos del 60% de identidad en la secuencia de L1; las especies de un género comparten una identidad de secuencia de 60 a 70% y los tipos virales dentro de una especie comparten de 71 a 89% de identidad de secuencia. Los VP conocidos que infectan tanto a humanos como a animales forman 16 géneros que se identifican por letras griegas. Cinco de estos géneros se componen exclusivamente de VPH's y VP's identificados en algunos primates, todos los otros géneros contienen tipos encontrados en varios mamíferos y aves.⁵

VPH Y CACU

Los virus del papiloma humano (VPH) son un grupo de virus ADN con tropismo cutáneo y mucoso. Casi todos (99,8%) los casos CACU se deben a tipos específicos de VPH. La relación entre el CACU y el VPH fue demostrada a principios de los años 80's por el doctor Harald zur Hausen y la infección es un requisito necesario para el desarrollo de esta enfermedad.⁵⁻⁹

La mayoría de las mujeres se infectan justo después de su primera relación sexual y la mayor prevalencia es en mujeres menores de 25 años de edad, sin embargo, en este grupo de edad la infección por VPH es transitoria también se ha observado en estudios transversales un segundo pico de prevalencia de esta infección en mujeres mayores de 40 años; cerca de la edad en el que la incidencia de carcinoma cervical es máxima.^{10 11}

La prevalencia de infección por VPH alrededor del mundo en mujeres va de un 2% a un 44%, más alta entre mujeres jóvenes, decayendo conforme la edad aumenta. Además, la incidencia de infección con tipos virales oncogénicos (de alto riesgo) parece ser más alta que aquella con tipos virales no oncogénicos (de bajo riesgo).⁵

Investigaciones han identificado que la infección por alguno de los 15 tipos de VPH de alto riesgo es necesaria, pero, no suficiente para causar CACU. El tipo VPH-18 es el que se ha asociado con mayor frecuencia a adenocarcinoma mientras que VPH-16 (seguido por el VPH-18) es frecuentemente detectado en carcinoma escamoso (Figura 4 y 5).²

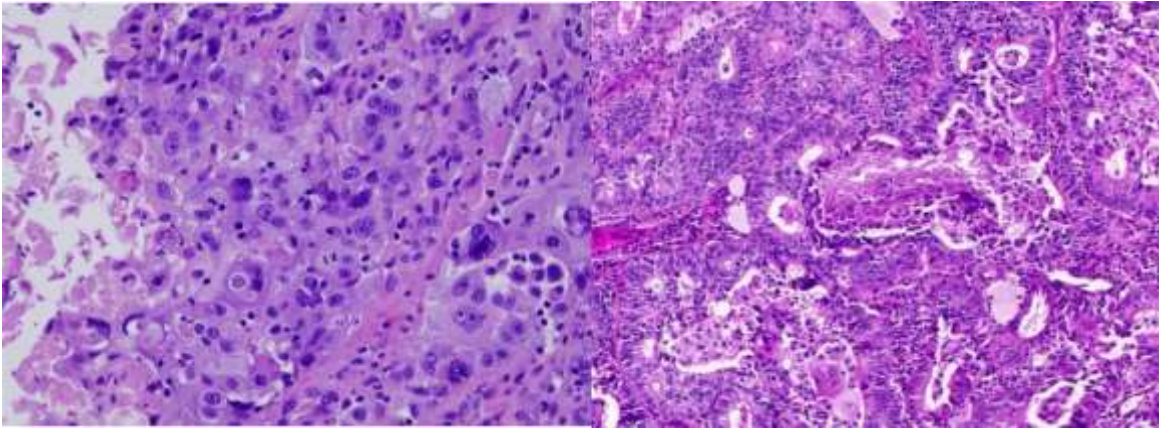


Figura 4

Figura 5

El carcinoma cervical invasor es generalmente evitable con un apropiado protocolo de seguimiento y tamizaje que permite la detección y el tratamiento de la mayoría de las lesiones precursoras antes de la invasión. ^{5,2-10}

Los efectos oncogénicos de los virus de alto riesgo son comúnmente atribuidos a las proteínas virales E6 y E7 que suspenden puntos clave en la regulación del ciclo celular inactivando supresores de tumores como p53 y pRb, respectivamente (Figura 6).

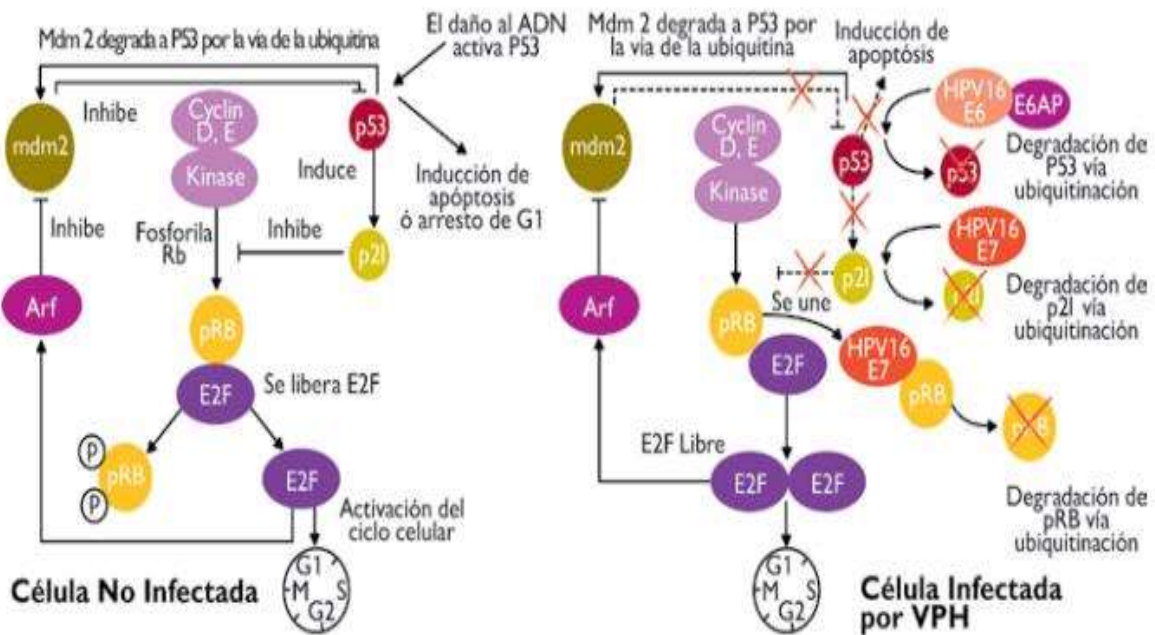


figura 6

La detección de lesiones en mujeres jóvenes menores de 21 años ha mostrado ser menos efectiva que para grupos de edades mayores. Los carcinomas que emergen en pacientes jóvenes parecen ser menos detectables por los métodos de tamizaje tradicional, además de ser más agresivos y presentan la posibilidad de emerger entre intervalos de tamizaje. Cuando las lesiones precancerosas son encontradas por los diversos medios de detección existentes, con frecuencia son tratadas con procedimientos quirúrgicos excisional (conización, histerectomía, traquelectomía) los que se asocian a embarazos problemáticos y otras morbilidades. También estas lesiones con frecuencia presentan regresión sin tratamiento. La Probabilidad de regresión es del 61% a 12 meses y del 91% a 36 meses de seguimiento^{12,2-3}. La Probabilidad de regresión es del 61% a 12 meses y del 91% a 36 meses de seguimiento.¹³

Un estudio hizo evidente que cuando el CACU se presenta en mujeres menores de 40 años el 78% tiene entre 30 y 39 años de edad al momento del diagnóstico, 21% se encuentran entre 20 y 29 años y 1% menor de 20 años, a los 14 años la incidencia fue casi de cero. La mayoría de estos casos fueron carcinomas escamosos, en mujeres hispánicas y presentaron menor sobrevida.³⁻¹⁰ Por lo tanto las infecciones genitales por VPH son frecuentes y comúnmente desaparecen dentro de un periodo de 2 años, sin embargo los subtipos de VPHs de alto riesgo pueden persistir y en algunos casos llevan a la formación de un carcinoma invasor¹⁴.

El VPH-16 es el más prevalente de los VPH oncogénicos, responsable de más de la mitad de los tumores, mientras que el VPH- 18 está involucrado en el 20% de los mismos¹⁵. Resulta relevante mencionar los resultados de un estudio que involucró cerca de 2,000 mujeres de 9 países con diagnóstico confirmado de carcinoma escamoso de cérvix, así como 2,000 controles, el

cual fue realizado con el fin de establecer la clasificación epidemiológica de los diferentes tipos de VPH que colonizan el tracto genital humano ¹⁶. El panorama general fue que son pocos los tipos de VPH que contribuyen a las infecciones en el tracto anogenital y que generalmente se encuentran tanto en personas asintomáticos como en pacientes con cáncer. Los tipos virales más frecuentes fueron: 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 y 35; mientras que en el caso de los controles, los más prevalentes fueron los tipos: 16, 18, 45, 31, 6, 58, 35 y 33. En conclusión, fue propuesto que además de los tipos 16 y 18, los VPH- 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 deben de ser considerados oncogénicos o tipos de “alto-riesgo”; mientras que los tipos 26, 53 y 56 son “probablemente de alto-riesgo”.

Las mujeres sexualmente activas, de cualquier edad, pueden infectarse con VPHs oncogénicos¹⁷. Sin embargo, el cáncer de cérvix invasor en mujeres jóvenes infectadas con virus oncogénicos es raro y la prevalencia de VPH en mujeres de 40 años o mayores no se correlaciona con la alta tasa de cáncer cervical. Es la persistencia de VPHs oncogénicos lo que da lugar al desarrollo de lesiones precancerosas y potencialmente al cáncer invasor, lo que puede llevar varios años para su desarrollo.

Estudios han demostrado que hay diferencias entre carcinoma escamoso y adenocarcinoma ya que aunque ambos son causados por VPH la distribución de los tipos responsables difiere de alguna manera. VPH-16 causa carcinoma escamoso en el 50 al 60% de los casos y VPH-18 del 15 al 20%, en contraste con el adenocarcinoma donde la prevalencia de VPH-16 y VPH-18 son de 33% y 37% respectivamente.¹⁶⁻¹⁸

VPH y vacunación

Investigaciones recientes sobre la seguridad y la eficacia de las vacunas profilácticas candidatas contra el VPH han mostrado resultados muy prometedores con una eficacia de casi el 100% en la prevención del desarrollo de infecciones persistentes y lesiones cervicales precancerosas. Estudios clínicos en curso se espera que aporten pruebas adicionales de la eficacia. Aunque el futuro parece prometedor con respecto a la vacunación contra el VPH, se necesitarán muchos años antes de que podamos ver los resultados a largo plazo de estas medidas. El monitoreo de los cambios en la prevalencia de HPV tipo específico permite evaluar el impacto de la población de este programa de vacunación. Un estudio inglés se evaluó la prevalencia de 7321 pacientes post-vacunación se encontró que la prevalencia de la infección por VPH16 / 18 disminuyó del 17,6% en solo un año posterior a la vacunación y he un seguimiento a 4 años la reducción fue aún mayor, estos datos demuestran una reducción en la prevalencia de los tipos virales incluidos en la vacuna contra el VPH, sin embargo la prevalencia de otros tipos como el 31 incremento levemente, sin embargo esto no fue estadísticamente significativo¹⁷¹⁹²⁰.

Es importante conocer la prevalencia de los tipos de VPH en nuestra población para estar preparados y tomar medidas adecuadas en caso de que esta prevalencia se modifique a través del tiempo debido a la implementación de los programas de vacunación.

Capítulo III

3.- Justificación.

- En una búsqueda intencionada en la literatura no se ha dado a conocer la distribución real de los tipos de alto y bajo riesgo en nuestra población y si alguno de ellos se asocia a carcinoma invasor en pacientes menores de 40 años.
- En una búsqueda intencionada en la literatura no se ha dado a conocer en nuestro medio la infección concurrente de más de un tipo de VPH.
- La distribución en nuestra población de los tipos de VPH de alto riesgo en mujeres jóvenes con lesiones invasoras podría ser relevante para el abordaje terapéutico, pronóstico y como base; ya que no existen evidencia de su distribución en nuestra población.
- Si los tipos de VPH compiten para colonizar el epitelio cervical, entonces la prevalencia de tipos de VPH que no se encuentran como blanco en las vacunas podría incrementarse.
- La distribución en nuestra población de los tipos de VPH de alto riesgo en mujeres jóvenes con lesiones invasoras podría ser relevante para el abordaje terapéutico y pronóstico en caso de detectar estos tipos de virus en pacientes jóvenes.

Capítulo IV

4.- Hipótesis.

Existen tipos de VPH específicos prevalentes asociados a un grupo de mujeres jóvenes con carcinoma cervical invasor.

Hipótesis nula.

No existen tipos de VPH específicos prevalentes asociados a un grupo de mujeres jóvenes con carcinoma cervical invasor

Capítulo V

5.- Objetivo general.

Identificar los tipos de VPH en carcinomas invasores en mujeres jóvenes mediante estudios de microaareglos.

.

Objetivos secundarios.

Determinar la incidencia anual del carcinoma cervical en nuestra región en un periodo de 10 años.

Determinar la incidencia por edad del carcinoma cervical en nuestra región/hospital.

Determinar la incidencia de carcinoma invasor en mujeres menores de 40 años (jóvenes).

Capítulo VI

6.- Material y métodos.

Criterios de inclusión:

- Casos de mujeres jóvenes (menores de 40 años) con diagnóstico histológico
- Casos de mujeres jóvenes (menores de 40 años) con diagnóstico histológico de carcinoma cervical invasor (Escamoso, Adenocarcinoma y variedades especiales). Tejido obtenido mediante biopsia insicional, cono o resección completa.
- Disponibilidad de bloques de parafina los cuales contengan tejido neoplásico maligno.
- Adecuada conservación del tejido que sea óptimo para su estudio con microarreglos.
-

Criterios de exclusión:

- Casos de mujeres mayores de 40 años
- Ausencia de bloques de parafina
- Inadecuada fijación del tejido
- Laminillas sin bloques de parafina
- Material insuficiente o inadecuado para realizar estudios de microarreglos

Se realizó una búsqueda en la base de datos electrónica del servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital " José Eleuterio González".

- Se incluyeron los casos cuyo diagnóstico fuera de carcinoma cervical invasor y microinvasor durante un periodo que abarca del 2004-2016.
- Se seleccionaran los casos que presenten las características óptimas para ser sometidos a estudios de microarreglos para la detección de los subtipos de VPH.
 - Bajo riesgo: 6, 11, 40, 42, 44, 54, 61, 71, 71, 81, 83, 84.
 - Alto riesgo: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 43, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82, 85, 89.

Búsqueda de pacientes y selección del material

La búsqueda de pacientes se llevara a cabo mediante el sistema Tesi electrónica (Pathox) como criterios de búsqueda se utilizaron: Casos de pacientes con diagnóstico de CACU invasor (escamoso, adenocarcinoma u otras variantes especiales) durante un periodo de 12 años 2010-2016. Posteriormente se trasladara esta base de datos al programa Excel donde se agregaran datos obtenidos de los reportes como hallazgos histopatológicos, como son las variedades especiales. Se filtraran los casos de pacientes menores de 40 años. Los casos seleccionados se buscaran en el almacén de bloques de parafina del servicio de anatomía patológica de hospital universitario de la UANL, se seleccionaras los bloques de parafina con tejido tumoral de mejor calidad y sin contaminantes (a criterio del patólogo investigador).

Estos bloques serán cotejados con la laminilla teñida con la técnica de hematoxilina y eosina para ser reevaluados en caso de ser necesarios, además de con el reporte original de diagnóstico.

Posteriormente se realizarán entre 4 y 7 secciones de aproximadamente 10 micras al bloque de parafina para la obtención de tejido tumoral parafinizado y se colocará en un tubo de ensaye o frasco correctamente identificado con el número del espécimen.

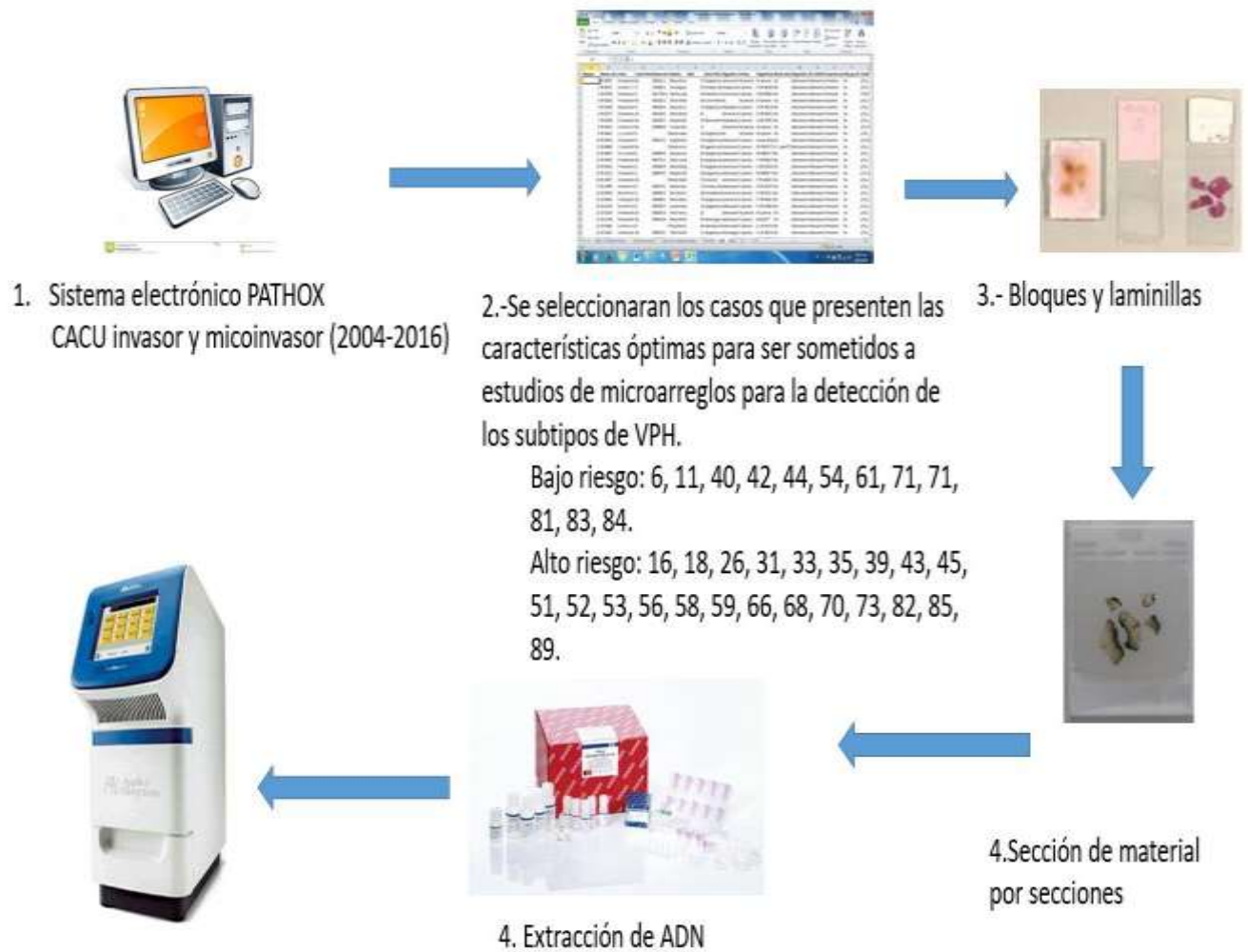


figura 7

Extracción de muestras embebidas en parafina:

1. Usando un bisturí, eliminar el exceso de parafina del bloque de muestra.
2. Obtener alrededor de 8 cortes de 5- 10 micras de grosor con micrótomo.
3. Si la superficie del bloque ha sido expuesta al aire ambiente descartar las primeras 3 cortes.
4. Colocar inmediatamente los cortes en un tubo de microcentrifuga de 1.5 o 2ml, y agregar 1 ml de xilol a la muestra. Cerrar la tapa y agitar en vortex vigorosamente por 10 segundos.
5. Centrifugar a máxima velocidad por 2 minutos a temperatura ambiente.
6. Eliminar el sobrante por pipeteo con cuidado de no tomar nada de la pastilla.
7. Adicionar 1 ml de etanol (96-100%) a la pastilla y mezclar en vortex. El etanol eliminara el xilol residual de la muestra.
8. Centrifugar a velocidad máxima velocidad por 2 minutos a temperatura ambiente.
9. Eliminar el sobrenadante por pipeteo con cuidado de no tomar nada de la pastilla.
10. Cuidadosamente eliminar cualquier residuo del etanol usando una punta fina de la pipeta.
11. Abrir el tubo e incubar a temperatura ambiente hasta que el etanol residual se haya evaporado.
12. Re suspender la pastilla en en 180 ml de buffer ATL, adicionar 20 ml de proteinasa K y mezclar por vortex.
13. Incubar a 56C/1hora, hasta la muestra haya sido totalmente lisada.
14. Colocar la muestra lisada en el QIQcube (en tubo de 2 ml).

Extracción del ADN

Una vez dentro del QIAcube, el equipo realizará una serie de procedimientos que permitirán la unión, lavado y elución del ADN.

Amplificación

Se programara el termociclador con los siguientes ciclos de temperatura:

Numero de ciclos	Temperatura (Celsius)	Tiempo (minutos: segundos)
1	95	09:00
45	94	00:30
	55	01:00
	72	01:30
1	72	08:00
Fin	4	--

Descongelar los tubos de reacción y mantenerlos en hielo.

Añadir 5 ml de DNA extraído a cada tubo de reacción. Re suspender con la pipeta.

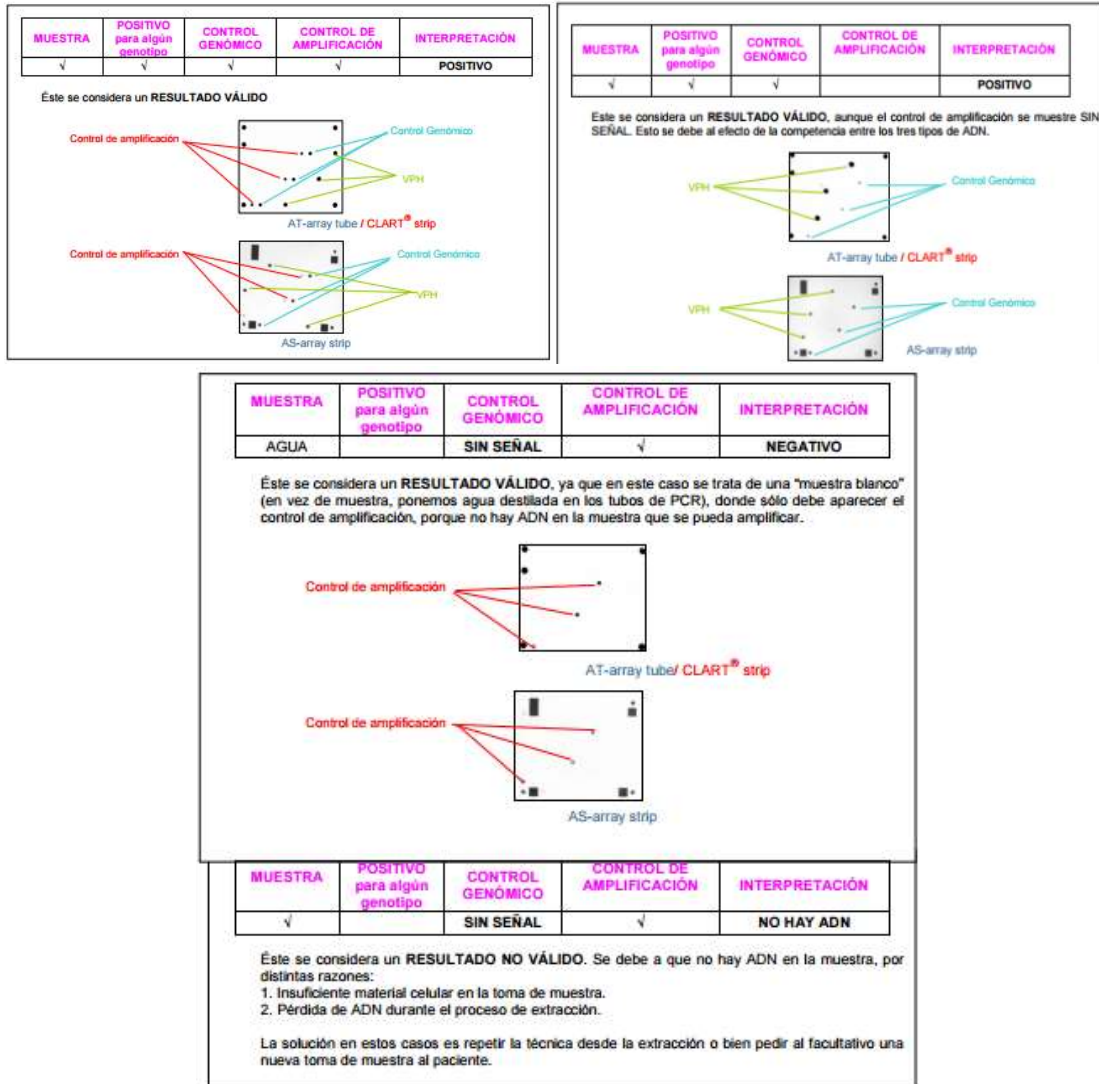
Colocar los tubos de reacción en el termociclador e iniciar el programa.

Lectura de resultados:

El procesamiento de los datos obtenidos a partir de cada uno de los análisis, se realiza de forma automática. El equipo de lectura y análisis presentara un informe en el que se indiquen los resultados.

Interpretación de resultados:

Uno de los inconvenientes de la detección de la amplificación genómica son los falsos negativos debidos a una calidad inadecuada del ADN de la muestra o bien a presencia de inhibidores de la ADN polimerasa en las muestras en las que se quiere analizar la presencia de VPH.



Sensibilidad analítica: La sensibilidad analítica se determinó mediante la amplificación del ADN de los distintos genotipos de VPH.

Especificidad analítica: La especificidad analítica es de un 100%. Con el kit CLART Papillomavirus humano 2 no se produce detección inespecífica de

otros virus patógenos habituales de muestras cervicovaginales, como son los herpesvirus.

En la siguiente tabla se ilustran los datos de sensibilidad y especificidad diagnósticas para cada uno de los 35 tipos de VPH detectados por el kit CLART® Papillomavirus humano 2:

Tipo	Sensibilidad	Especificidad	Tipo	Sensibilidad	Especificidad
6	100,00	99,72	56	100,00	100,00
11	100,00	99,73	58	100,00	99,86
16	100,00	99,85	59	100,00	99,59
18	100,00	100,00	61	100,00	99,72
26	100,00	100,00	62	100,00	99,72
31	100,00	99,86	66	100,00	99,71
33	100,00	100,00	68	100,00	99,73
35	100,00	100,00	70	100,00	99,86
39	100,00	99,86	71	100,00	100,00
40	100,00	99,87	72	100,00	100,00

El procesamiento de los datos obtenidos a partir de cada uno de los análisis, se realiza de forma automática. El equipo de lectura y análisis presentara un informe en el que se indiquen los resultados

Análisis de resultados

Posteriormente se realizó análisis variado de los datos. Para la comparación de diversos factores se utilizara la prueba de chi-cuadrada con corrección de Yates y prueba exacta de Fisher según sea necesario. Para comparar la presencia de co-infección de los serotipos, se utilizó regresión logística. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó en el software R v 3.3.2.

Capítulo VII

7.- Resultados

De la base de datos del servicio se obtuvieron 1099 casos de CACU diagnosticados por primera vez para su análisis el rango total de edad se encontró entre los 16 y 96 años. La media de edad fue 48.24 ± 14.34 años. La edad de presentación de enfermedad fue entre los 40 y 49 años

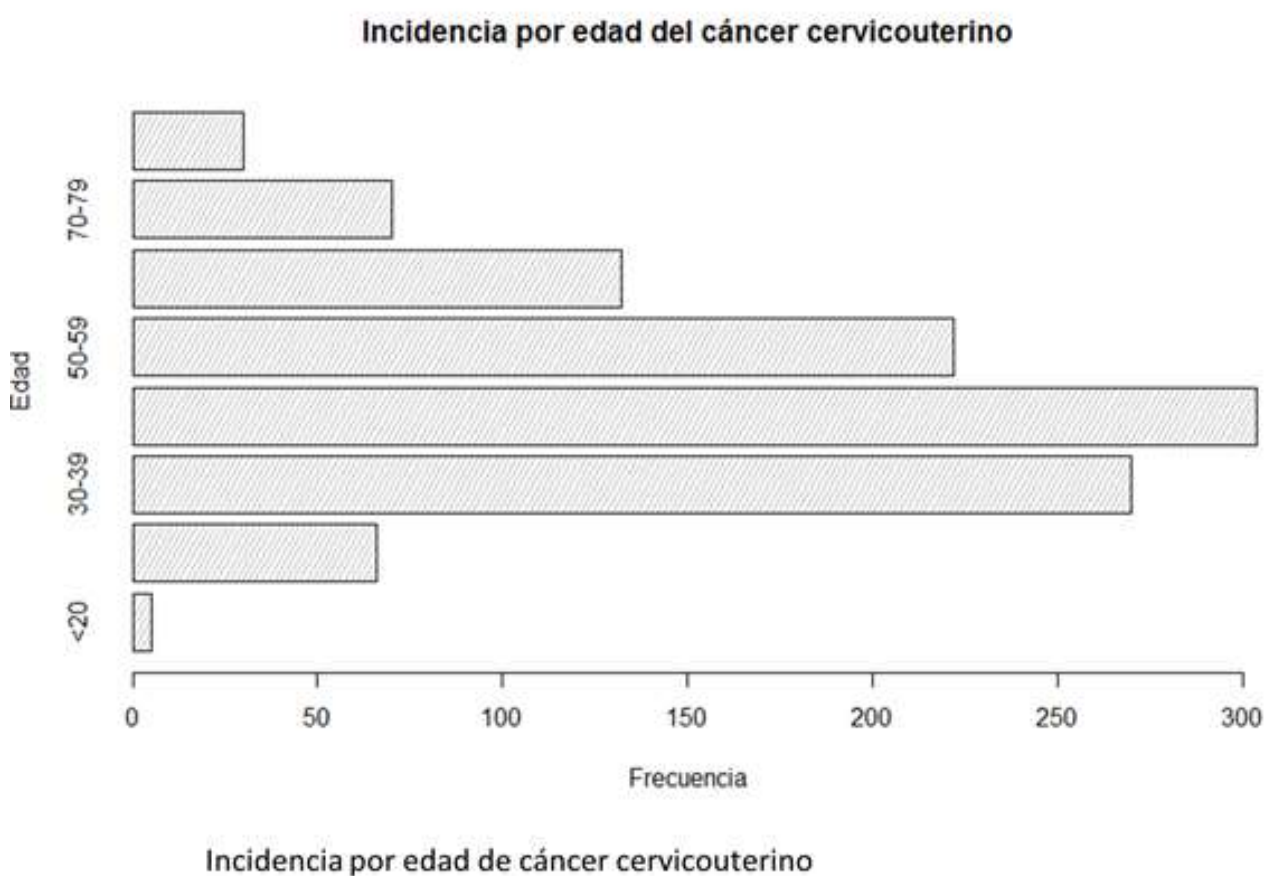


Figura 8

El año con la mayor incidencia fue el 2004

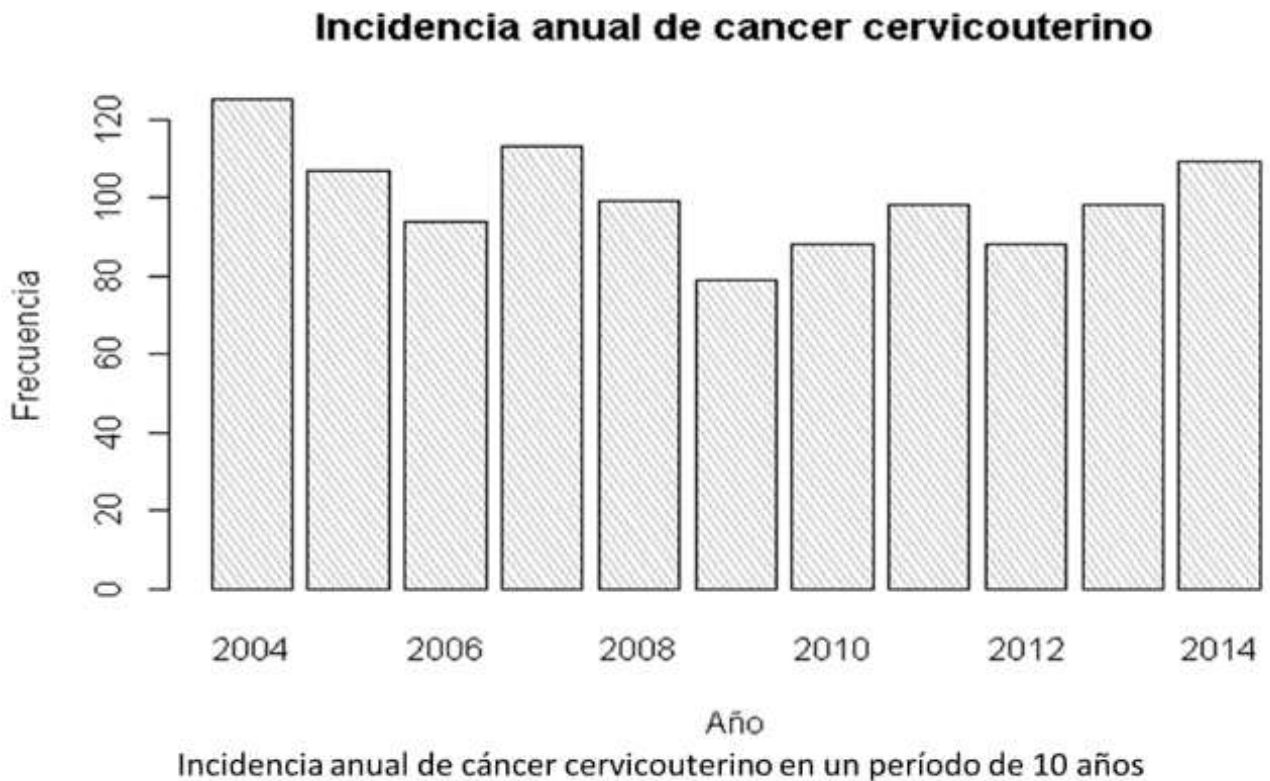


Figura 9

En esta serie 153 (13.92%) fueron adenocarcinomas y el resto 71 casos (6.4%) correspondieron a una variedad especial.

El diagnóstico en edad temprana ($p < 0.001$) y un menor grado de diferenciación ($p < 0.001$) estuvieron asociados a una presencia de invasión al momento del diagnóstico.

Carcinoma espinocelular:

La media de edad de presentación fue de 48.39 ± 14.30 años del total de casos

El 67.77% fueron CE queratinizantes y el 30.4% no queratinizantes.

Con respecto a la tipificación histológica el 98.55% correspondió a células grandes y 1.45% a células pequeñas. El 44.8% presento invasión angiolinfática y el 55.2% no la presento.

Tabla 1

Queratinizante	67.77%
No queratinizante	30.4%
Células grandes	98.55%
Células pequeñas	1.45%

Diferenciación	%
Bien diferenciado	1.26%
Moderadamente diferenciado	91.54%
Poco diferenciado	7.2%

Adenocarcinoma

La media de edad de presentación fue de 48.22 ± 13.79 años. 3.94% fueron bien diferenciados, el 88.98% moderadamente diferenciados y el 7.09% poco diferenciados

El 42.18% presento invasión angiolinfática y el 58.17% no la presentaron. Respecto a la variedad histológica 36(23.53%) fueron variedad clásica, 11(7.19%) fueron adenoescamosos, 3(0.65%) de células claras, 57(37.25%) fueron endocervicales, 26(16.99%) endometrioides, 4(2.61%) intestinales, 1(0.65%) mesonérico, 1(0.65%) mucinoso , 12(7.84%) fueron papilares y 1(0.65%) intestinales.

Tabla 2

Endocervical usual	60.78%
Células claras	37.25%
Endometrioides	2.61%
Mucinoso intestinal	0.65%
Mucinoso endocervical	0.65%
Papilar	7.84%
Adenoescamoso	0.65
Mesonefrico	0.65

Diferenciación	%
Bien diferenciado	3.94
Moderadamente diferenciado	88.98%
Poco diferenciado	7.09%

Resultados generales de la tipificación y distribución viral (Tabla 3).

51 casos cumplieron con los criterios de inclusión.

La media de edad de presentación fue de 34.04 (5.56) años.

La variante más frecuente fue el carcinoma escamoso con 34(66.66%) casos.

La mayor parte de los casos fueron moderadamente diferenciados (63.04%).

La invasión angiolinfática estuvo presente en 41.66% de los casos.

Tabla 3

	n	Escamoso	Adenocarcinoma	Otros
	51	34(66.66)	11(21.57)	6(11.76)
Edad	34.039(5.56)	33.97(5.28)	33.73(6.28)	35(6.75)
	16	24(70.59)	9(81.82)	6(100)
	18	13(38.24)	6(54.55)	4(66.66)
	56	14(41.18)	10(90.91)**	3(50)
	40	1(2.94)	0(0)	0(0)
	35	1(2.94)	0(0)	0(0)
	36	0(0)	0(0)	1(16.66)
	59	1(2.94)	0(0)	0(0)
	45	5(14.70)	1(9.09)	2(33.33)
** indica p< 0.01	11	1(2.94)	0(0)	0(0)

34 casos fueron de carcinoma escamoso, del total 79% eran no queratinizantes de células grandes.

El virus más frecuentemente aislado fue 16 con 39(76.47%) de los casos.

La expresión del tipo 18 en los adenocarcinomas endocervicales fue de 80%.

El virus tipo 56 se expresó con menor frecuencia en carcinoma escamoso (41.17%) en comparación con las demás variedades de carcinoma combinadas (76.47% ,p= 0.02091, IC 95 0.04,0.91).

56.86% presentaron infección con más de un serotipo

43.14% de los casos presentan infección por un solo virus

El VPH tipo 18 ($p < 0.001$, IC95% [2.02,6.41]) y El VPH tipo 56($p < 0.001$, IC 95% [1.30, 3.60]) fueron los más asociados a co-infección en comparación con los otros serotipos

Capítulo VIII

8.- Discusión

La incidencia del CACU por edad en México ha cambiado a través de los años y ha ido en decremento, en el año 2002 la incidencia al momento del diagnóstico se encontraba entre los 45 y 60 años, sin embargo para el año 2010 esta cifra se ha reducido y se encuentra entre los 30 y 45 años en nuestra experiencia la media de edad es cercana a estos valores encontrándose una media de edad de 48. 24 años al momento del diagnóstico. La incidencia promedio en México en un periodo de 10 años fue de 8209 por año, con la mayor incidencia en el año 2007 en contraste en nuestro estudio se encontró la mayor incidencia en el año 2004.²¹

En nuestro estudio el 79.62% de los casos correspondieron a carcinoma escamoso, el 13.92% correspondieron a adenocarcinomas y el 6.4% pertenecían a una variedad especial, esto discrepa un poco con lo descrito en la literatura internacional donde el 70% corresponden a carcinoma escamoso y el 15-20% a adenocarcinoma²²²³.

También obtuvimos una variación con respecto al grado de diferenciación ya que en nuestra serie el carcinoma escamoso bien diferenciados es un 1.26%, moderadamente diferenciado 91.54% y poco diferenciado 7.2%, mientras que la literatura menciona porcentajes muy estrechos entre estos grados; bien

diferenciados 29.8%, moderadamente diferenciado 39.2% y poco diferenciado 30.9%²⁴.

En este trabajo el diagnóstico de CACU a edad temprana se asoció a la presencia de invasión y por tanto a un estadio clínico más avanzado esto concuerda con algunos autores que aseveran que entre más temprano el diagnóstico es más severa la enfermedad, sin embargo algunos autores como Clive A Meanwell et al, demostraron en un estudio que la edad no es un factor determinante comparadas con otras pacientes de diferente edad pero con mismo estadio clínico y grado histológico.

El pobre grado de diferenciación también estuvo asociado a la presencia de invasión y por tanto a un estadio avanzado, esto concuerda con la mayoría de los trabajos publicados por varios autores^{25 26}.

En nuestro estudio la media de presentación al momento del diagnóstico en pacientes menores de 40 años fue de 34 años en un estudio realizado por P M Elliott, et al se encontró una media de presentación en pacientes jóvenes de 35 años lo que corresponde con lo encontrado en este estudio(Tabla 4)¹⁰.

En un estudio de 10022 pacientes menores de 40 años el porcentaje de pacientes con carcinoma escamoso fue del 78% y de solo 6.6% de adenocarcinoma, el resto fueron variedades especiales, en contraste en nuestra serie identificamos variación en estos valores, con 66.6% de carcinomas escamosos, 21.57% de adenocarcinomas y el resto corresponde a variedades especiales²⁵¹⁰.

Tabla 4

Distribución de variedades en pacientes menores de 40 años		
Variedad	Nuestra serie	Serie de 10022 casos (PM Elliot et al.
Escamoso	66.6%	78%
Adenocarcinoma	21.57%	6.6%
Otras variedades	11.83	15.4

Este es el primer reporte en Nuevo León México sobre la tipificación y variabilidad de los genotipos de VPH asociados a CACU en mujeres jóvenes (menores de 40 años), se identificó además diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los tipos de VPH prevalentes en CACU.

Aunque los tipos más prevalentes de VPH en la literatura son el 16 y 18, la detección de genotipo 56 varia ampliamente en el mundo, algunos reportes sugieren que las diferencias en la prevalencia de estos tipos de VPH en CACU pueden ser debidas a factores relacionados con el estrato socioeconómico²⁷.

La heterogeneidad en los tipos de VPH podría ser particularmente relevante en nuevo león y en México ya que no se conoce la tipificación de los mismos, además que esta podría variar en un futuro cercano debido a la aplicación de vacunas contra los genotipos más frecuentes, y de este modo dar “oportunidad” de infección por otros menos prevalentes en la actualidad ²⁷.

A nivel mundial y en América central se ha descrito una mayor proporción de infección por VPH 16 y 18 en casos de CACU²⁷¹³.

En nuestro estudio se detectó co-infección en 56.86% de los casos (Tabla 5), un porcentaje mayor que el reportado por la literatura internacional (varían entre 9 y 40%), pero muy similar a lo reportado en países latinoamericanos con estratos socioeconómicos bajos, las co-infecciones²⁸²⁷

En nuestra serie el VPH tipo 18 ($p < 0.001$, IC95% [2.02,6.41]) y El VPH tipo 56 ($p < 0.001$, IC 95% [1.30, 3.60]) fueron los más asociados a co-infección en comparación con los otros serotipos. Esto difiere de la literatura internacional donde no se ha reportado una incidencia tan alta del VPH 56 (Tabla 6)²⁸²⁹.

En un estudio de genotipificación de virus en la región sur de México solo se aislaron como co-infección los virus 11, 18 y 33³⁰.

Tabla 5

Casos con Co-infección	Nuestra serie	Internacional (general)	Países latinoamericanos
% Co-infección por más de un solo tipo	56.86%	9-40%	26-66%

Tabla 6

Porcentaje de co-infección por genotipo en nuestra serie	
VPH 16	90.91%
VPH 18	100%
VPH 56	90.91%

El VPH 16 se encontró en el 76% de los casos siendo el que con más frecuencia se encontró en nuestra serie, aunque esto concuerda con la literatura internacional su identificación en CACU se ha reportado en un 52- 58% de los casos.

El VPH 18 estaba presente en el 45% de los casos y fue el tercero en el adenocarcinoma donde se identificó en un 54.55%, seguido por el vph 16 con n 81.82% (Tabla 7).

De manera interesante el VPH 56 se aisló en un 52% de los casos totales en nuestra serie, en un 41.18% en carcinoma escamosos y sorprendentemente en un 90.91% (Tabla 7) en los casos de adenocarcinoma (siendo más frecuente casi en el doble que el tipo 18, $p < 0.01$), algo que no se ha descrito en la literatura (donde es el octavo mas encontrado en el mundo con excepción de Europa donde es el 52), en el continente o en este país internacional (Tabla8) ¹⁸³¹.

Tabla 7

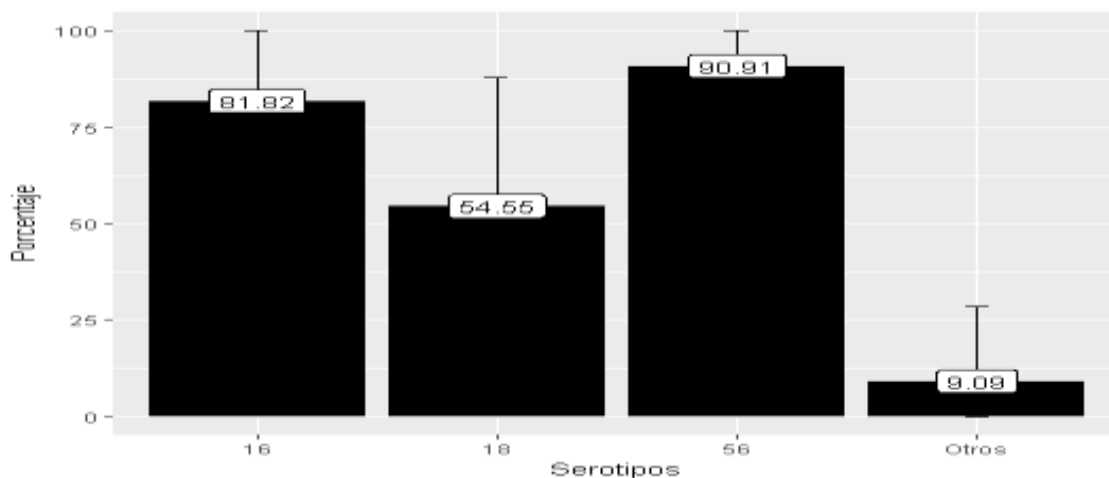


Tabla 8

Total de casos de CACU con infección	Nuestra serie	Literatura
VPH 16	76%	52-58%
VPH 18	45%	65-76% (Europa- Sur América)
VPH 56	52%	0.9 (LIEAG)

Tabla 9

	Total (n=8977)	Europe (n=2058)	North America (n=160)	Central South America (n=3404)	Africa (n=544)	Asia (n=2641)	Oceania (n=170)
HPV 56	75 (<1%)	32 (2%)	1 (<1%)	20 (<1%)	4 (<1%)	18 (<1%)	..
Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study Dr Silvia de Sanjose, MD et al							

Otro hallazgo interesante fue que identificamos un caso de carcinoma escamoso donde se identificó un VPH 11 de bajo riesgo sin co-infección por otro VPH ³².

Este tipo de VPH de bajo riesgo se ha llegado a asociar a carcinoma escamoso en un 0.1% esto fue en una serie de 6874 casos de carcinoma escamoso.

Además se ha asociado a lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIEAG) en un 1.3% en una serie de 3,762 casos de LIEAG. Con un índice de prevalencia de carcinoma escamoso /LIEAG de 0.09 (0.05–0.18)¹⁸⁻³².

Capítulo IX

9- Conclusión.

Se encontró VPH 16, 56 y 18 en 66.88% de los CACU.

Estos hallazgos deben ser confirmados en estudios de prevalencia que incorporen un mayor número de casos con las mismas características en esta región, y agregar instituciones tanto públicas como privadas, en donde se pueda recoger prospectivamente mayor información sobre los casos.

Una vacuna profiláctica anti VPH 16 y 18 serían, teóricamente, útil en la prevención de lesiones causadas por estos tipos de VPH.

Sin embargo, el beneficio potencial de la vacuna podría ser heterogéneo a lo largo de la región y el tiempo en caso de que la prevalencia en solitario o en co-infección del subtipo 56 sea relevante.

Capítulo X

10. - Bibliografía.

1. Alemán-meza L, Gómez-macías GS, Barboza-quintana O, Garza-guajardo R, Loya-solis A. Case Report Osteoclastic Giant Cell Rich Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix : A Case Report and Review of the Literature. 2014;2014(Figure 1):1-4. doi:10.1155/2014/415328.
2. Woodman C., Collins S., Young C., Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues - ProQuest. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(January):11-22. doi:10.1038/nrc2050.
3. Benard VB, Watson M, Castle PE, Saraiya M. Cervical carcinoma rates among young females in the United States. *Obstet Gynecol*. 2012;120(5):1117-1123. doi:http://10.1097/AOG.0b013e31826e4609.
4. Watkins MM, Gabali C, Winkleby M, Gaona E, Lebaron S. Barriers to cervical cancer screening in rural Mexico. *Int J Gynecol Cancer*. 2002;12(5):475-479. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12366665>.
5. Mundial N. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. 2006;1:31-55.
6. Park EK, Cho H, Lee SH, et al. Human Papillomavirus Prevalence and Genotype Distribution among HIV-Infected Women in Korea. 2014:32-37.
7. De Freitas AC, Coimbra EC, Leitão M da CG. Molecular targets of HEPV oncoproteins: Potential biomarkers for cervical carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2014;1845(2):91-103. doi:10.1016/j.bbcan.2013.12.004.
8. Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology*. 2009;384(2):260-265. doi:10.1016/j.virol.2008.11.046.
9. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and

taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.* 2005;32(SUPPL.):1-6.
doi:10.1016/j.jcv.2004.10.021.

10. Elliott PM, Tattersall MHN, Coppleson M, et al. Changing character of cervical cancer in young women. 1989;298(February):1987-1989.
11. Popadiuk C, Stankiewicz A, Dickinson J, Pogany L, Miller AB, Onysko J. Invasive cervical cancer incidence and mortality among canadian women aged 15 to 29 and the impact of screening. *J Obstet Gynaecol Can.* 2012;34(12):1167-1176. doi:10.1016/S1701-2163(16)35464-0.
12. Arbyn M, Castellsagué X, de sanjosé S, et al. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol.* 2011;22(12):2675-2686.
doi:10.1093/annonc/mdr015.
13. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: A pooled analysis. *Lancet.* 2005;366(9490):991-998. doi:10.1016/S0140-6736(05)67069-9.
14. Boulenouar S, Weyn C, van Noppen M, et al. Effects of HPV-16 E5, E6 and E7 proteins on survival, adhesion, migration and invasion of trophoblastic cells. *Carcinogenesis.* 2010;31(3):473-480. doi:10.1093/carcin/bgp281.
15. Reimers LL, Anderson WF, Rosenberg PS, Henson DE, Castle PE. Etiologic heterogeneity for cervical carcinoma by histopathologic type, using comparative age-period-cohort models. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(3):792-800. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0965.
16. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castetellaasague X SK et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348:518-527.
17. Franco EL, Harper DM. Vaccination against human papillomavirus infection: A new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine.* 2005;23(17-18):2388-2394. doi:10.1016/j.vaccine.2005.01.016.

18. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007;121(3):621-632. doi:10.1002/ijc.22527.
19. Mesher D, Panwar K, Thomas SL, Beddows S, Soldan K. Continuing reductions in HPV 16/18 in a population with high coverage of bivalent HPV vaccination in England: an ongoing cross-sectional study. *BMJ Open*. 2016;6(2):e009915. doi:10.1136/bmjopen-2015-009915.
20. Li Y, Zeng WJ, Ye F, et al. Application of hTERC in thinprep samples with mild cytologic abnormality and HR-HPV positive. *Gynecol Oncol*. 2011;120(1):73-83. doi:10.1016/j.ygyno.2010.10.007.
21. Anaya-Ruiz M, Vincent AK, Perez-Santos M. Cervical cancer trends in Mexico: Incidence, mortality and research output. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2014;15(20):8689-8692. doi:10.7314/APJCP.2014.15.20.8689.
22. A_Comparison_of_Adenocarcinoma_and_Squamous_Cell.23.pdf.
23. Rasmussen A, Ice J a, Li H, et al. Comparison of the American-European Consensus Group Sjogren's syndrome classification criteria to newly proposed American College of Rheumatology criteria in a large, carefully characterised sicca cohort. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(1):31-38. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203845.
24. Fujiwara K, Monk B, Devouassoux-Shisheboran M. Adenocarcinoma of the Uterine Cervix: Why Is it Different? *Curr Oncol Rep*. 2014;16(12). doi:10.1007/s11912-014-0416-y.
25. C.A. M, K.A. K, S. W, et al. Young age as a prognostic factor in cervical cancer: analysis of population based data from 10,022 cases. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1988;296(6619):386-391.
<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L18039330%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=02670623&id=doi:&atitle=Young+age+as+a+prognostic+factor+in+cervical+cancer:+Analysis+of+population+based+data+from+10,0>.

26. Han CH, Cho HJ, Lee SJ, et al. The increasing frequency of cervical cancer in Korean women under 35. *Cancer Res Treat.* 2008;40(1):1-5. doi:10.4143/crt.2008.40.1.1.
27. Valdivia L IM, Aguayo G F, Pruyas A M, Snijders PJF, Corvalán R A, Ferreccio R C. Genotipos de virus papiloma humano (VPH) en pacientes con cáncer cervico-uterino en un hospital público y una clínica privada de Santiago, Chile. *Rev Chil infectología.* 2010;27(1):11-16. doi:10.4067/S0716-10182010000100001.
28. Meftah El Khair M, El Mzibri M, Mhand RA, et al. Molecular detection and genotyping of human papillomavirus in cervical carcinoma biopsies in an area of high incidence of cancer from moroccan women. *J Med Virol.* 2009;81(4):678-684. doi:10.1002/jmv.21279.
29. Salehi-Vaziri M, Sadeghi F, Hashemi FS, et al. Distribution of Human Papillomavirus Genotypes in Iranian Women According to the Severity of the Cervical Lesion. *Iran Red Crescent Med J.* 2016;18(4):16-21. doi:10.5812/ircmj.24458.
30. Domínguez-Arrevillaga S, Sánchez-González RA, Becerra- Victorio G, et al. Frecuencia genotípica del virus del papiloma humano en población general de la frontera sur de México. *Enf Inf Microbiol.* 2011;31(1):6-10.
31. de Sanjose S, Quint WG V, Alemany L, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010;11(11):1048-1056. doi:10.1016/S1470-2045(10)70230-8.
32. Cornall AM, Roberts JM, Garland SM, Hillman RJ, Grulich AE, Tabrizi SN. Anal and perianal squamous carcinomas and high-grade intraepithelial lesions exclusively associated with “low-risk” HPV genotypes 6 and 11. *Int J Cancer.* 2013;133(9):2253-2258. doi:10.1002/ijc.28228.

31. Watkins MM, Gabali C, Winkleby M, Gaona E, Lebaron S. Barriers to cervical cancer screening in rural Mexico. *Int J Gynecol Cancer*. 12(5):475-479. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12366665>. Accessed January 18, 2016.