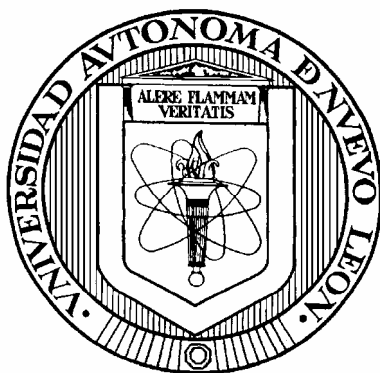


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**“ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO DE LESIONES
PREMALIGNAS Y CANCEROSAS DE CÉRVIX EN MUJERES INFECTADAS CON
EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO”**

Por

M.C.P. SOFÍA BERNAL SILVA

**Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS con
especialidad en BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA.**

Junio, 2007

“Estudio de la susceptibilidad al desarrollo de lesiones premalignas y
cancerosas de cérvix en mujeres infectadas con el virus del papiloma humano”

Aprobación de la tesis:

DR HUGO A. BARRERA SALDAÑA

Director de Tesis

DRA. GERALDINA GUERRERO GONZÁLEZ

Co-director de Tesis

DR. LEZMES D. VALDEZ CHAPA

Co-director de Tesis

DR DIONICIO A. GALARZA DELGADO

Subdirector de Estudios de Posgrado

TABLA DE CONTENIDO

SECCIÓN

PÁGINA

TABLA DE CONTENIDO	i
LISTA DE CUADROS	iv
LISTA DE FIGURAS	iv
ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vii

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1	Introducción	1
1.2	Antecedentes Generales	4
1.2.1	Cáncer cérvicouterino	4
1.2.1.1	Tipos y clasificación	4
1.2.1.2	Incidencia	5
1.2.1.3	Etiología	6
1.2.1.4	Medicina preventiva	8
1.2.1.5	Tratamiento	10
1.2.2	Displasias	11
1.2.2.1	Definición y Clasificación	11
1.2.2.2	Manejo	12
1.2.3	Virus del Papiloma Humano (VPH)	13
1.2.3.1	Características generales	13
1.2.3.2	Mecanismos de infección y transformación	15
1.2.3.3	Descripción de las variantes del VPH	18
1.2.3.4	Herramientas moleculares de detección	24
1.2.4	Susceptibilidad	29
1.2.4.1	Respuesta inmune ante la infección viral	29
1.2.5	Aspectos inmunológicos implicados en la susceptibilidad	31

1.2.5.1	Papel de la presentación antigénica en la respuesta inmune	31
1.2.5.2	El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC)	34
1.2.5.3	Alelos de HLA asociados a la enfermedad	42
1.2.5.4	Herramientas moleculares para la tipificación de los alelos de HLA	44
1.2.6	Biomarcadores	47
1.3	Justificación	50

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

2.1	Objetivo general	52
2.2	Objetivos específicos	52

CAPÍTULO III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1	Lugar de realización del estudio	53
3.2	Grupo de estudio	53
3.3	Material y reactivos	54
3.3.1	Materiales	54
3.3.2	Reactivos	54
3.4	Equipo	55
3.5	Estrategia general	56
3.6	Métodos	57
3.6.1	Procedimientos para el estudio epidemiológico	57
3.6.2	Procedimientos para el estudio clínico gine-histopatológico	57
3.6.3	Análisis genético	58

3.6.4	Detección y tipificación del VPH	58
3.6.5	PCR anidadas para muestreo de los resultados negativos para VPH	59
3.6.6	Tipificación de alelos DQB1 del complejo principal de Histocompatibilidad clase II (HLA clase II)	60
3.7	Análisis estadístico	62

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Resultados	63
4.1.1	Detección viral	63
4.1.2	Prevalencia viral	65
4.1.3	Persistencia viral	66
4.1.4	Resultados clínicos	67
4.1.5	Resultados epidemiológicos	71
4.1.6	Resultados genéticos	72
4.2	Discusión	75

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
-----------------------------------	----

ANEXOS

ANEXO I	96
ANEXO II	97
ANEXO III	98

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	104
-------------------------------	-----

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Biological properties and genome organization characteristics for each genus.	20
Cuadro 2.	Características epidemiológicas.	72
Cuadro 3.	Frecuencias generales, alélicas y génicas para el gen DQB1.	73
Cuadro 4.	Valores de riesgo (OR) para susceptibilidad o resistencia de los alelos del gen DQB1 del HLA clase II.	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	VPH y estructura de su genoma.	14
Figura 1.2	Mecanismo molecular de transformación.	17
Figura 1.3	Presentación antigénica.	32
Figura 1.4	Interacción estrecha entre un linfocito T y una célula dendrítica.	33
Figura 1.5	Ordenamiento de los genes del MHC en el cromosoma 6.	36
Figura 1.6	Molécula HLA clase I.	37
Figura 1.7	Molécula HLA clase II.	39
Figura 4.1	Detección del VPH y tipo de infección.	64
Figura 4.2	Incidencia según el grado de riesgo oncogénico viral.	65
Figura 4.3	Prevalencia del VPH.	66
Figura 4.4	Persistencia viral por grupos de riesgo oncogénico.	67
Figura 4.5	Resultados cito e histopatológicos.	68
Figura 4.6	Comparación entre citologías y biopsias.	70
Figura 4.7	Resultados de citologías y biopsias por grupos.	71

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Concentración micromolar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
h	Horas
min	Minutos
seg	Segundos
ml	Mililitros
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	-log [H ⁺]
Taq	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
X	Veces la concentración
UV	Luz Ultravioleta
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
rpm	Revoluciones por minuto
V	Voltios
VPH	Virus del papiloma humano
PV	Papilomavirus
nm	Nanómetro
M	Concentración molar
mg	Miligramo
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario al RNA
°C	Grados centígrados
NaOH	Hidroxido de sodio

SDS	Dodecilsulfato de sodio
mM	Milimolar
v/v	Volumen-volumen
L	Litro
HCl	Acido clorhídrico
BSA	Albumina sérica bovina
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sodio
KCl	Cloruro de potasio
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potasio
CO ₂	Bióxido de carbono
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
T _m	Temperatura de fusión
“HLA” y “MHC”	Complejo principal de
histocompatibilidad	
%	Por ciento
°C	Grados centígrados
CaCU	Cáncer cérvicouterino
LIEBG y LSIL	Lesión intraepitelial de bajo grado
LIEAG y HSIL	Lesión intraepitelial de alto grado
NIC I	Neoplasia intraepitelial cervical grado I
NIC II	Neoplasia intraepitelial cervical grado II
NIC III	Neoplasia intraepitelial cervical grado III
IL	Interleucina
n	Tamaño de la muestra

RESUMEN

MCP Sofía Bernal Silva

Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina

Fecha de Graduación: Junio de 2007.

Área de estudio: Biología Molecular.

Número de páginas: 104

Título del estudio: “Estudio de la susceptibilidad al desarrollo de lesiones premalignas y cancerosas de cérvix en mujeres infectadas con el virus del papiloma humano”

Introducción: Existe un gran número de pacientes que no es capaz de eliminar adecuadamente la infección por el VPH (20% aproximadamente). Se piensa que existen ciertas características que pudieran ser detectados por métodos moleculares, y que aunados a co-factores de riesgo epidemiológicos y clínicos, pudieran constituir una “etiqueta” para un seguimiento oportuno más individualizado que permita economizar así los limitados recursos del sector salud, pero que al ser centrados en la atención de este tipo de mujeres en alto riesgo, haya verdaderamente la diferencia en su curación.

Objetivo: Practicar una segunda visita a mujeres aparentemente sanas que fueron positivas para VPH en el 2002 para continuar el seguimiento clínico e investigar el papel de la persistencia viral y de los alelos de HLA en la progresión de lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado hacia CaCU.

Material y Métodos: Se estudiaron 188 pacientes entre el año 2005 y 2006 partiendo de un grupo de 600 mujeres positivas para la infección por VPH en el 2002. Se les realizó toma de Pap, colposcopia y cepillado para tipificación del VPH. A partir del DNA de sangre se realizó el estudio de alelos del MHC clase II DQB1.

Resultados: El 72% de las mujeres logró eliminar la infección que presentaban en el 2002. De las mujeres positivas el 12% fueron por el mismo tipo viral que en el 2002. El tipo viral más prevalente fue el VPH-83. Fue posible observar cierta tendencia de algunos alelos como factores de riesgo de persistencia viral, como son los alelos DQB1*0609/18, DQB1*0501, DQB1*0301/13 y el alelo DQB1*0202.

Conclusiones: Fue posible determinar los alelos que probablemente se asocian a persistencia viral, sin embargo la muestra fue limitada en cuanto a las pacientes persistentes, por lo que la asociación se observa como una tendencia sin significancia estadística.

DR. HUGO A. BARRERA

Director de Tesis

DRA. Sci. GERALDINA GUERRERO

Co-Director de tesis

DR. LEZMES D. VALDEZ

Co-director de tesis

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Genómica y Bioinformática del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Dirección del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña y la Co-Dirección de la Dra. Sci. Geraldina Guerrero González y el Dr. Lezmes D. Valdez Chapa.

DR. HUGO A. BARRERA SALDAÑA

Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACYT el apoyo brindado para participar como estudiante de maestría en el desarrollo de este trabajo.

A la Secretaría de Salud del Estado de Nuevo León por su valioso apoyo para localizar pacientes y realizar los estudios colposcópicos.

Agradezco al Dr. Barrera por todas sus enseñanzas, gracias por enseñarme lo que es realmente la investigación y a poner los pies en la tierra.

Gracias a la Dra. Herminia, jefa del Depto., por su paciencia y apoyo.

Al Dr. Juan Francisco González del Centro Universitario contra el cáncer por ayudarnos con la adquisición del colposcopio y por todo su apoyo.

Gracias al M. en C. Oscar Fajardo, “mi teacher”, por abrir el camino en esta línea de investigación y enseñarme las técnicas que iba a utilizar, gracias por todos tus “tips”.

A los amigos: Iván Marino, Irám Rodríguez, Margarita Martínez, Juan Manuel Leyva por hacerme pasar gratos momentos entre tanta adversidad. Especialmente **gracias a Michelle** que me dio soporte en los momentos difíciles, tú sabes cuánto te lo agradezco Michelle.

Agradezco a la Dra. Clara Gorodezky y a la Dra. Carmen Alaez del INDRE por su ayuda en la tipificación e interpretación de los alelos del HLA.

Gracias a mis Co-Directores de Tesis por toda su paciencia, enseñanzas y apoyo.

A todas las mujeres que participaron activamente en el proyecto donando sus muestras, gracias por preocuparse por su salud y ayudarnos a mejorar la medicina preventiva en nuestro país.

Mil gracias a mi familia, sin ustedes no podría haber salido adelante. Gracias en especial **a mis padres** porque gracias a ellos soy quien soy y puedo decir que soy feliz y me siento satisfecha.

Especialmente gracias a ti José, eres lo mejor en mi vida, eres mi luz y mi alegría. Gracias por tu paciencia y comprensión, por todo tu cariño, jamás terminaré de agradecer lo feliz que me haces.

Gracias Dios, por ponerme en el lugar y en el momento correcto para ser cada día mejor.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Introducción.

Para prevenir con eficacia el cáncer cérvicouterino (CaCU) invasivo en México, se requiere combinar los más recientes conocimientos genético-moleculares con métodos analíticos de prevención secundaria que incluyen tamizaje poblacional, diagnóstico temprano, tratamiento y adecuado seguimiento de la evolución/regresión de las lesiones intraepiteliales.

Los métodos actuales para detección oportuna del CaCU presentan una baja sensibilidad (68% para el Papanicolaou y 88% para la citología en base líquida). Por otra parte, la detección molecular del virus del papiloma humano (VPH), en el caso de lesiones intraepiteliales de alto grado, presenta una sensibilidad cercana al 100% cuando se compara con el estándar de oro (coilocitosis en la citología cervical). Por este motivo, es necesario implementar métodos de detección del VPH en pacientes clasificadas en el grupo de alto riesgo de progresión a CaCU. El reto actual consiste en saber ¿cómo identificar a este grupo de pacientes? Se conoce que la gran mayoría de las mujeres infectadas por el VPH eliminarán la infección sin dificultades (del 70 – 80% de los casos), esto gracias sobre todo a una adecuada respuesta inmune (principalmente celular). Sin embargo, considerando la población mexicana, existe un gran número de pacientes que no es capaz de eliminar adecuadamente la infección

(20% aproximadamente). Se piensa que existen ciertas características en este grupo de mujeres que pudieran ser detectados por métodos moleculares, y que los hallazgos de estos, aunados a co-factores de riesgo de naturaleza epidemiológica y clínica, pudieran constituir la “etiqueta personalizada” para un seguimiento oportuno más individualizado que permita economizar así los limitados recursos del sector salud, pero que al ser centrados en la atención de este tipo de mujeres en alto riesgo, haga verdaderamente la diferencia en su curación.

Es muy importante, por lo tanto, identificar biomarcadores moleculares que nos permitan distinguir a las mujeres en alto riesgo para desarrollo del CaCU, para así mejorar la capacidad de detectarlas tempranamente y tratarlas oportunamente.

El sistema inmune juega un papel primordial en la respuesta del huésped ante la infección por el VPH, debido a que éste despierta una respuesta inmune adaptativa de tipo celular aunada a la respuesta innata que se basa en la producción de interferón y activación de las células asesinas naturales (NK). Los linfocitos reconocen al patógeno de forma clonal propiciando una respuesta inflamatoria contra la infección. La respuesta celular tienen la capacidad de eliminar la infección hasta en más del 70% de los casos, el resto (20 – 30%) permanecen como infecciones persistentes. Una vez que el VPH infecta las células del epitelio cervical, las partículas virales y algunas proteínas del virus son procesadas en el interior de las células y posteriormente son presentadas en la superficie celular como péptidos antigénicos. Los receptores de linfocitos T reconocen los péptidos antigénicos virales que son presentados por

moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) en la superficie celular de las células presentadoras de antígenos y de esta forma se monta la respuesta inmune en contra del VPH para ser eliminado del huésped.

Debido a la importancia del MHC en el control de la infección por el VPH, el presente trabajo se desarrolló para buscar alelos de susceptibilidad en nuestra población, ya que no solo los estudios realizados en el tema varían de acuerdo a las poblaciones étnicas, si no también porque no se han practicado en la misma población.

1.2 Antecedentes Generales.

1.2.1 Cáncer cérvicouterino (CaCU).

1.2.1.1 Tipos y clasificación. Los tumores epiteliales del cérvix se clasifican en tres ramas principales de acuerdo a su histología: 1) carcinoma de células escamosas (queratinizante, no queratinizante, verrugoso, papilar transicional y linfoepitelioma), 2) adenocarcinoma (mucinoso, endometriode, vello glandular bien diferenciado, adenoma maligno, de células claras, seroso y mesonéfrico) y 3) otros, como el adenoescamoso, de células vidriosas, adenoideo quístico, adenoideo basal, carcinoide y el de células pequeñas (1).

El proceso de transformación neoplásica toma varios años (1). Por ejemplo, el cambio de un epitelio normal a cáncer *in situ* puede llevarse a cabo en cinco años y el cambio a cáncer invasor hasta en diez (1).

Para el caso del cáncer invasor, la Federación Internacional de Gineco-Obstetricia (FIGO) estableció en 1998 una clasificación de acuerdo a los datos clínicos encontrados durante la exploración física de la paciente (Anexo I).

Las herramientas para la estadificación son la inspección, palpación, colposcopía, curetaje endocervical, cistoscopía, rectosigmoidoscopia, urografía excretora y radiografía de tórax, pero cada uno de los estudios se solicita en forma selectiva(1).

La distribución de la enfermedad por etapas clínicas (EC) se ha observado de la siguiente forma: EC I: 28%, EC II: 34%, EC III: 33% y EC IV: 5% (1).

1.2.1.2 Incidencia. El CaCU es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, representando el 10% de todos los procesos malignos en mujeres y acumulando aproximadamente 371,000 casos nuevos por año (471,000 casos nuevos en el 2000, según reporte del 2005 de la IARC). Además, este padecimiento ocupa el tercer lugar en frecuencia a nivel mundial después de los cánceres de mama y colon (2, 3). El 80% de los casos se presentan en países en desarrollo (4) y constituye cerca del 30% del total de neoplasias en mujeres latinoamericanas (5, 6). En los últimos 30 años, las tasas de incidencia y mortalidad del CaCU han disminuido más del 75% en los países desarrollados, gracias a la efectividad de sus programas de prevención basados en tamizajes citológicos y colposcópicos, aunados al tratamiento de sus lesiones precursoras (7).

Por el contrario, en México para la década de 1990 al 2000 se reportaron oficialmente un total de 48 761 defunciones por esta causa, iniciando en 1990 con 4 280 muertes en el año y terminado en el 2000 con 4 620. Esto representa un notable aumento en la incidencia y mortalidad registradas, con un promedio de una mujer fallecida cada dos horas a causa de esta enfermedad, así como un crecimiento promedio anual de los casos absolutos de mortalidad de 0.76% (8).

Dentro de los tumores malignos que afectan a la población femenina en México, el CaCU es el más frecuente, representando un 14.4% de las defunciones por esta causa. Además es causante de una alta morbilidad hospitalaria, ya que de cada 100 egresos femeninos por tumores malignos, 32 se deben a este tumor y dentro de las causas de muerte en mujeres en edad productiva y reproductiva constituye la primera (9).

1.2.1.3 Etiología. Existen diversos factores de riesgo para el CaCU, dentro de los cuales se ha encontrado que el más importante es la infección persistente con el VPH. Este es considerado como un factor independiente y necesario (10) para el desarrollo de este cáncer y sus lesiones intraepiteliales de bajo (LSIL) y alto grado (HSIL), encontrándose en el 80 al 99% de los casos (11, 12 y 13). Sin embargo, su presencia no es suficiente para el desarrollo de la neoplasia, ya que requiere, además de los factores virales en sí (genotipos y variantes, carga viral e integración al genoma), la participación de co-factores que pueden ser medioambientales, como el consumo de tabaco, uso de anticonceptivos orales, multiparidad, inmunosupresión, infección por VIH/SIDA y enfermedades de transmisión sexual como la *Chlamydia* y el Herpes (87, 88).

También se encuentran los co-factores que se refieren al comportamiento individual como inicio de vida sexual temprana, conducta de alto riesgo, falta de uso de métodos anticonceptivos de barrera y el tener como pareja a varones promiscuos de riesgo de contagio elevado, no circuncidados y con mala higiene genital; así como factores genéticos en donde se encuentra incluida la

variabilidad biológica de las mujeres que les predisponen para la infección viral y para la progresión de la misma (7). En México se han publicado resultados en cuanto a los factores de riesgo más importantes para la infección por VPH, mostrando que la mortalidad por CaCU se encuentra relacionada además de con los factores de riesgo antes mencionados, con factores como pobreza, falta de escolaridad, desempleo, bajo nivel socioeconómico, residencia en áreas rurales y la falta de acceso efectivo a los servicios de salud (8). Más recientemente se le ha dado también importancia al papel del hombre como transmisor del virus a través del contacto sexual, considerándosele como un factor determinante para el contagio (30).

La infección asintomática se encuentra en el 5-40% de las mujeres en edad reproductiva (14). La mayoría de las veces la infección se presenta de manera transitoria y es poco frecuente encontrar pacientes con infección persistente (15). Se ha reportado que solo una pequeña proporción de mujeres positivas para un tipo dado de VPH continúa siendo positiva para el mismo tipo en muestreos posteriores (14), lo que denota persistencia viral, condición considerada primordial para el desarrollo de CaCU. Sin embargo, debido al alto porcentaje de mujeres infectadas que no desarrollan cáncer, se piensa que deben existir otros factores que contribuyen al desarrollo de esta neoplasia. En este sentido, está ampliamente demostrado que el cigarro es un co-factor importante ya que se han encontrado metabolitos del cigarro como nicotina y N-nitrosaminas en muestras de moco cervical (16, 17), sin embargo la relación causa-efecto aun no ha sido demostrada con estudios epidemiológicos más

específicos. La epidemiología tradicional correlaciona la exposición a agentes carcinogénicos directamente con el desenlace del cáncer, quedando como desconocido todo lo que sucede durante la historia de la enfermedad entre causa y desenlace. Sin embargo, para la epidemiología molecular lo que sucede durante el desarrollo de la enfermedad es de gran importancia. Las vías moleculares y los mecanismos que se llevan a cabo para llegar al desarrollo del tumor son objeto de estudio y para tal efecto se ha dirigido la investigación en los modelos experimentales hacia la dosificación de carcinógenos (dosis efectivas), efectos biológicos y la relación estructura/función de los mismos (18).

1.2.1.4 Medicina preventiva. La Secretaría de Salud en nuestro país ha hecho del CaCU una prioridad nacional de salud, debido a su alta incidencia y mortalidad. Sin embargo, la tasa de mujeres que se practican el papanicolaou continúa siendo baja (92). Esto se debe principalmente a que los servicios disponibles de diagnóstico y prevención son subutilizados por las mujeres mexicanas, debido entre otras causas a la desinformación sobre el tema y por la dificultad para el acceso a las áreas de apoyo de las mujeres que habitan zonas rurales (91, 92).

Algunos de los principales factores relacionados con el bajo uso de los servicios de prevención y detección temprana reportado por la Secretaría de Salud de algunos estados, tienen que ver con una falta de conocimiento sobre las causas y las medidas preventivas de la neoplasia, así como el desconocimiento de la

infraestructura médica para prevenirla, detectarla y tratarla oportunamente, al igual que las barreras culturales que mantienen alejadas de estos servicios a las mujeres (91). A pesar de que estos son algunos de los factores principales en nuestro país, no deberían dejarse de lado algunos otros factores ajenos a las pacientes, como lo es la mala técnica en la toma de muestra cervical y el procesamiento de la misma. Además, en los países desarrollados donde la difusión es mucho más amplia, aún existe falta de concordancia en los métodos de tamizaje entre los distintos departamentos de especialidades médicas. Así lo reportan, por ejemplo, Irwin y cols. (2006) quienes realizaron un estudio para conocer el grado de concordancia en el conocimiento sobre el VPH, tamizaje, manejo de citologías anormales, pruebas para detección del VPH y prácticas de consejería para la paciente. Ellos encontraron que la mayoría de las personas que trabajan en esta área saben que la infección por el VPH es causa de neoplasias y CaCU, sin embargo son pocas quienes practican la consejería con las pacientes y pocas también quienes tienen el conocimiento sobre la curación de la infección por VPH, aún sin tratamiento.

Los gineco-obstetras y las enfermeras especialistas son quienes practican el más alto número de citologías y el uso de la prueba para detección del VPH. El conocimiento sobre cómo se maneja la información, así como la capacitación dentro del personal médico es importante para un manejo adecuado e integral de las pacientes, ya que las líneas de tamizaje y prevención oportuna han comenzado a cambiar desde la introducción de nueva metodología para la detección del VPH por técnicas moleculares a mediados de los años noventas.

Organizaciones como la Sociedad Americana de Cancerología (ACS), el Colegio Americano de Gineco-Obstetricia y las Fuerzas para las Tareas de Servicios Preventivos de los Estados Unidos, recomiendan ahora iniciar el tamizaje para CaCU a la edad de 21 años o dentro de los tres primeros años de inicio de vida sexual. Algunas organizaciones como la ACOG y la ACS recomiendan además el uso de nuevas tecnologías específicas, como son la detección de DNA viral (VPH) y el uso de la citología en base líquida dentro del tamizaje (19).

1.2.1.5 Tratamiento. Las pacientes en etapa Ia sin invasión vascular ni linfática pueden tratarse mediante conización terapéutica y vigilancia estrecha o una histerectomía total extrafascial, dependiendo del deseo de fecundidad de la paciente.

Para la etapa Ia2 es necesario programar a la paciente para una histerectomía radical y linfadenectomía pélvica. Si existiera alguna contraindicación quirúrgica-médica puede atenderse con radioterapia y en casos de invasión menor a 3mm es suficiente con braquiterapia intracavitaria.

El tratamiento primario para la etapa Ib2 es la quimiorradioterapia concomitante, acompañada de resección en casos de enfermedad residual. Y en el caso de etapas IIa, las pacientes sólo reciben quimiorradioterapia, con excepción de ciertos casos en donde se presenta extensión limitada al fórnix de la vagina,

situación en la que se puede ofrecer histerectomía radical con linfadenectomía pélvica.

En el caso de las etapas IIB, III y IVa, la terapéutica a seguir se basa en la quimioterapia. Mientras que en el caso de la etapa IVb, en donde menos del 20% sobrevive a dos años, se da tratamiento paliativo con quimioterapia (1).

1.2.2 Displasias.

1.2.2.1 Definición y Clasificación. En países desarrollados, la incidencia de CaCU ha disminuido notablemente. Sin embargo, las lesiones precursoras de esta enfermedad, conocidas como lesiones o neoplasias intraepiteliales cervicales, constituyen uno de los problemas de salud que más comúnmente se encuentran en mujeres en edad reproductiva en países como Estados Unidos.

La prevención del CaCU requiere de la erradicación de estas lesiones precursoras (20). El término de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) fue introducido desde 1973 por Richart quien lo definió como una población de células atípicas de grosor completo y que se subdivide de acuerdo al grado de atipia y maduración observadas en dichas células y en 1955 Koss y Durfee observaron que algunas atipias escamosas presentaban cambios nucleares que sólo se observaban en las células de la capa superficial del cérvix, a lo que le llamaron “atipia coilocítica”, lo que ahora es conocido como coilocitos y que se sabe corresponde a infección por VPH (22).

En 1988 se propuso, por el Instituto Nacional de Cancerología de Estados Unidos, la clasificación de las lesiones precursoras en dos categorías, de acuerdo a los hallazgos citológicos: las lesiones de bajo y de alto grado (LSIL y HSIL por sus siglas en inglés). Esta clasificación es conocida como el Sistema Bethesda para lesiones precancerosas (23). Las LSIL corresponden a aquellas lesiones conocidas previamente como neoplasias intraepiteliales grado I (NIC I). Mientras que las HSIL corresponden a las lesiones previamente conocidas como NIC II y III. El nuevo sistema de clasificación tiene tres ventajas sobre el anterior (conocido como clasificación de Papanicolaou): 1) provee terminología diagnóstica uniforme que facilita la comunicación entre el laboratorio y el clínico, 2) incorpora la evaluación de la calidad de la muestra especificando si esta es o no adecuada y 3) elimina los números utilizados en Papanicolaou (21).

1.2.2.2 Manejo. En Septiembre de 2001 se llevó a cabo un consenso por la Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical (ASCCP por sus siglas en inglés) en donde se buscaron lineamientos para el manejo de las anomalías encontradas en la citología, así como para las lesiones premalignas. En primer lugar todo resultado citológico positivo para una lesión debe ser confirmado por biopsia guiada por colposcopia. La nomenclatura utilizada para el reporte de las biopsias continúa siendo NIC I a III, de acuerdo a los cambios histológicos observados. Las mujeres con diagnóstico confirmado de NIC I con colposcopia satisfactoria podrán ser manejadas de forma conservadora, debido a que la gran mayoría presentan regresión de la lesión.

Además, los intervalos de seguimiento pueden variar de 3 a 12 meses y el tiempo de seguimiento debe ser de meses a años y habiéndose observado que el 9 a 16% de los casos de lesiones NIC I evolucionan a NIC II y III.

En el caso de diagnósticos confirmados de NIC II y III, debe tomarse en cuenta que el porcentaje de lesiones NIC II que presentan regresión en ausencia de tratamiento es del 43%, las que persisten un 35% y las que progresan a carcinoma in situ o cáncer invasor un 22% (comparado con las lesiones NIC III, las cuales regresan solo en un 32%, persisten en 56% de los casos y un 14% progresan). Por lo que las recomendaciones dadas por la ASCCP consisten en realizar remoción de la lesión en cuestión utilizando la técnica de preferencia, como pueden ser las ablativas: crioterapia, vaporización con laser, electrocauterización, diatermia o coagulación con frío; o las excisionales: extirpación amplia en forma de lazo, conización laser y conización con bisturí frío. Después del tratamiento debe darse seguimiento cada 4 a 6 meses durante dos años y después puede continuarse con el tamizaje habitual (20).

1.2.3 Virus del Papiloma Humano (VPH).

1.2.3.1 Características generales. El VPH pertenece a un grupo de virus denominados papillomavirus de la familia *Papillomaviridae*. Este grupo de virus posee cápside icosaédrica, genoma circular de DNA de doble cadena de aproximadamente ocho mil pares de bases y asociado a histonas, no encapsulado, con un diámetro de ~52 a 55 nm (24). Infecta exclusivamente células epiteliales de mucosa y/o epidermis con capacidad proliferativa (25) y

tiene la capacidad de permanecer asociado al huésped por largos períodos de tiempo (pp 312).

Su genoma se divide en tres regiones: **1)** la de genes de expresión temprana (E1 a E8), implicados en la producción de proteínas reguladoras de la transcripción, replicación y oncogénesis (E6 y E7). **2)** la de genes de expresión tardía, que codifican para proteínas de la cápside (L1 y L2) y **3)** la llamada región larga controladora (LCR), la cual contiene regiones de regulación transcripcional y el origen de replicación (26) (*Figura 1.1*).

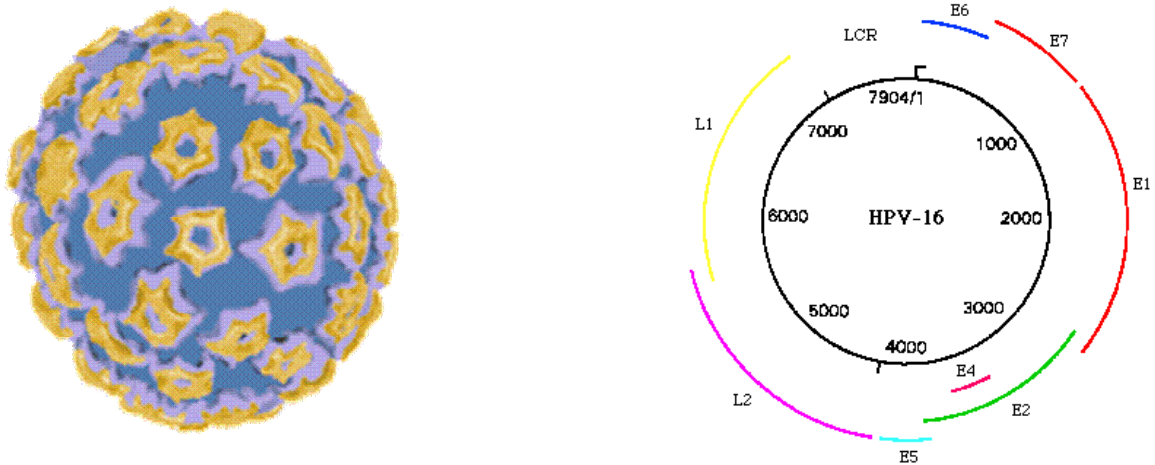


Figura 1.1. VPH y estructura de su genoma. Se muestra la apariencia de la partícula viral y del lado derecho un esquema de la estructura genómica del VPH 16, formado por 7,904 pb aproximadamente e indicando los genes de mayor importancia y como están distribuidos. (En línea)⁸⁹

Estos virus tienen la capacidad de producir ya sea verrugas o bien displasia y tumores en los sitios de infección, dependiendo del tipo viral (27).

Hasta el 2003 existían más de 320 tipos diferentes de VPH identificados, de los cuales 85 ya han sido secuenciados. Estos virus son específicos de especie y en la especie humana se pueden clasificar de acuerdo al sitio que infectan, por lo que se dividen en orales, del tracto genital, tracto respiratorio y cutáneos. Más de 50 tipos se han asociado a lesiones del tracto anogenital y se clasifican de acuerdo al tipo de epitelio que infectan en mucosos y cutáneos (28). De acuerdo a su capacidad para desarrollar lesiones intraepiteliales y/o CaCU (capacidad oncogénica) se dividen en dos grupos: los de bajo y alto riesgo. El grupo de alto riesgo (también conocido como grupo de VPHs oncogénicos) está constituido por los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58 y 68 (28), aunque en una publicación más reciente se incluyen también a los tipos 51, 59, 73 y 82, considerándose como de probable alto riesgo a los tipos 26, 53 y 66 (29). El VPH oncogénico más común es el tipo 16, el cual es detectado en más del 50% de los casos (13). Por otro lado, dentro del grupo de bajo riesgo se encuentran 12 tipos diferentes: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y 89 (29, 30).

1.2.3.2 Mecanismos de infección y transformación. Se cree que el VPH entra al epitelio del cérvix a través de lesiones microscópicas que se forman durante la relación sexual. Una vez que el virus se encuentra dentro del epitelio del cérvix, infecta las células de la capa basal e incrementa la proliferación celular expresando sus genes tempranos, como es el caso de E5, E6 y E7. Al emerger las células a la capa suprabasal, el virus comienza a expresar los

genes tardíos y es entonces cuando comienza su replicación y la formación de nuevas partículas virales (32).

Conforme la infección va progresando, el DNA episomal del virus se integra al DNA de la célula huésped y una parte del genoma viral (genes E5, E4 y E2) es excluido al integrarse. Los genes E6 y E7, que han sido implicados en la oncogénesis, se integran al genoma del huésped junto con el resto del genoma viral (31) (*Figura 2*). Aún no se ha esclarecido si la integración del genoma viral es un requisito para la progresión de la enfermedad (28). A dichos genes se les ha adjudicado un papel importante en la transformación celular, ya que se ha reportado que son suficientes para immortalizar células humanas en cultivo al actuar en conjunto; mientras que de sus proteínas (E6 y E7) se sabe que interaccionan con proteínas supresoras de tumores (p53 y RB), bloqueando su actividad. Específicamente, al interaccionar E6 con p53 causa la degradación de esta última, así como la de la proteína BAK, lo cual lleva a resistencia a la apoptosis y a un aumento en la inestabilidad cromosómica.

Por otra parte, es conocido que la interacción con la proteína E6 da estabilidad a la familia de quinasas SRC (al inhibir su degradación), lo que se ha relacionado con estimulación del crecimiento celular y el fenotipo de transformación por VPH. La proteína INK4A o p16 (inhibidor de quinasas dependiente de ciclina) contrarresta estas funciones de E6.

La proteína E7 a su vez interacciona con y degrada a RB para posteriormente producir la liberación del factor de transcripción E2F, el cual regula positivamente a INK4A. E7 estimula además la expresión de los genes para ciclina A y E, lo cual sirve para contrarrestar el efecto inhibitor de INK4A sobre E6. Otra posible función de E7 es el bloqueo de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina p21 y p27, también conocidos como WAF1 y KIP1 respectivamente (31), lo que conlleva a esto a perpetuar la proliferación celular y evitar la apoptosis.

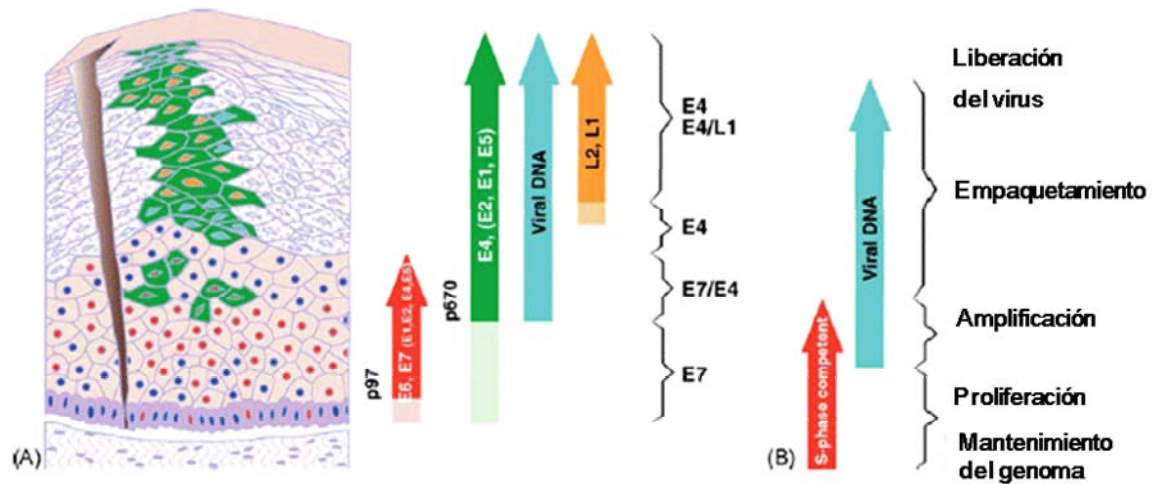


Figura 1.2. Mecanismo molecular de transformación. Se observa como se va dando la transformación celular durante el ciclo vital del VPH a través de promotores específicos que funcionan en diferentes capas del epitelio cervical. Cada promotor va dirigiendo diferentes etapas del ciclo desde el mantenimiento del genoma hasta la liberación de partículas virales a través de la expresión de las proteínas del VPH. (Tomado de Doorbar J y cols, 2005)³²

1.2.3.3 Descripción de las variantes del VPH. El VPH cuenta con un genoma muy estático, por lo que es raro encontrar mutaciones y recombinaciones. Gracias al hallazgo de hibridaciones cruzadas durante la clasificación de los VPHs, fue que se comenzó a desarrollar la taxonomía. La región más conservada en el genoma es aquella que codifica para la proteína estructural L1 (33). Durante muchos años se ha tomado en cuenta esta región para diferenciar entre tipos de VPHs, por lo que se considera un nuevo tipo viral si (el genoma completo se ha clonado) la secuencia del marco de lectura de L1 del nuevo aislamiento difiere por más del 10% de la del VPH más cercano. Si la diferencia es entre 2 y 10% se considera entonces como un subtipo y si la diferencia es menor al 2% entonces se considera como una variante intratípica (34).

Para dar el nombre a un nuevo virus se marca temporalmente con las iniciales del individuo o del laboratorio que lo descubrió y se le designa su numeración definitiva hasta después de caracterizar el genoma completo. La secuencia del genoma del virus encontrado se deposita en el centro de referencia para Papilomavirus (Heidelberg).

Existe un sitio, en la red del INTERNET (website), de secuencias el cual fue establecido por Myers y cols. en 1994 (<http://hpv-web.lanl.gov/stdgen/virus/hpv/compendium/htdocs>). En julio de 2000 durante la XVIII Conferencia Internacional del Papilomavirus en Barcelona, se decidió que para diferenciar las clonas aisladas de forma convencional y aquellas cuyas secuencias de sus genomas fueron generadas utilizando amplificación por PCR

(método conocido como “fragmento traslapado”) se debe nombrar a las últimas con el término: HPV cand # (35).

La clasificación taxonómica de los VPHs tiene tres objetivos: 1) establecer la relación entre los diferentes tipos, 2) comparar el término “tipo” con los términos “especie” y “género” (que ya son aplicados dentro de la virología) y 3) investigar la relación entre clasificación taxonómica y las propiedades biológica y patológica de los virus. Por lo tanto, la nueva clasificación agrupará a los VPHs no sólo por su riesgo oncogénico, sino también por su similitud filogenética y propiedades biológicas y patológicas (*Cuadro 1*). Sin embargo, existen algunos casos donde los análisis filogenéticos no coinciden con la patología, como los grupos que contienen VPHs causantes de lesiones genitales y que también contienen algunos tipos que causan lesiones cutáneas como lo es el VPH-2 (36).

Para la clasificación taxonómica se utilizaron 96 tipos humanos de VPHs y 22 papilomavirus (PVs) animales. Las principales diferencias entre la antigua y nueva clasificaciones taxonómicas radican en tres puntos principales: a) antes se decía que los PVs genitales antes se les decía que eran una rama principal o un súper-grupo. A esto se le conoce ahora como “género”. Los integrantes de géneros comparten menos del 60% de sus secuencias para el marco de lectura de L1. b) los agrupamientos de menor orden que se conocían previamente se les conocía como grupos, subgrupos o ramas menores, ahora se conocen como “especie” y comparten dentro del mismo género entre 60 a 70% de identidad

nucleotídica para L1; c) los tipos de una misma especie comparten entre 71 y 89% de identidad nucleotídica para L1.

Cuadro 1. Biological properties and genome organization characteristics for each genus.

Genus	Biological properties	Genome organization
Alpha-papillomavirus	Mucosal and cutaneous lesions in humans and primates High- and low-risk classification based on molecular biological data – high-risk types (pre- and malignant lesions) immortalize human keratinocytes; low-risk types (benign lesions) do not. Recent compilations of epidemiological data demonstrate more frequent association of specific species as high-risk types.	Conserved with an E5 ORF within the ELR ^a (ca. 300 – 500 bp) ORFs in ELR from different species may be divided into three groups: - Classical E5 ORF - Closer related to the ungulate E5 ORF - Putative ORF with distinct conserved motives^b
Beta-papillomavirus	Cutaneous lesions in humans. Infections exist in latent form in general population, activated under conditions of immune suppression. Also referred to EV-HPV types due to close association with disease <i>Epidermodysplasia verruciformis</i> (EV)	ELR is generally less than 100nt in length E5 ORF absent
Gamma-papillomavirus	Cutaneous lesions in humans – histologically distinguishable by intracytoplasmic inclusion bodies specific for type species.	ELR is generally less than 100 nt in length. E5 ORF absent
Delta-papillomavirus	Lesions in ungulates Induces fibropapillomas in the respective host Trans-species transmission occurs inducing sarcoids	ORFs located in ELR have transforming properties.
Epsilon-papillomavirus	Bovine papillomavirus cutaneous papillomas in cattle	
Zeta-papillomavirus	Cutaneous lesions in horses	Undefined ORF overlapping with L2 ORF
Eta-papillomavirus	Avian papillomaviruses Cutaneous lesions in host	E4 and E5 ORFs absent No typical E6 ORF, but an ancestral E7 ORF with partial E6 characteristics
Theta-papillomavirus	Avian papillomaviruses Cutaneous lesions in host	E4 and E5 ORFs absent No typical E6 ORF, but an ancestral E7 ORF with partial E6 characteristics
Iota-papillomavirus	Rodent papillomaviruses Cutaneous lesions	E5 ORF absent E2 ORF considerably larger than in other genera
Kappa-papillomavirus	Isolated from rabbits Cutaneous and mucosal lesions	E6 ORF larger than in other papillomaviruses.

		Harbors an uncharacterized E8 ORF within the E6 ORF region.
Lambda-papillomavirus	Animal papillomaviruses Benign mucosal and cutaneous lesions	ELR region exceptionally large (1500 bp and 1271 bp in 2 known species)
Mu-papillomavirus	Human papillomaviruses Cutaneous lesions – histologically distinguishable by intracytoplasmic inclusion bodies specific for type species	URR relatively large (982 bp and 558 bp for two known species)
Nu-papillomavirus	Human papillomavirus Benign and malignant cutaneous lesions	Several larger uncharacterized ORFs scattered throughout genome. E2 binding sites in URR all modified.
Xi-papillomavirus	Bovine papillomaviruses Induce true papillomas in host. Cutaneous or mucosal lesions	Characteristic E6 ORF absent E8 ORF (located in E6 ORF region) with properties similar to E5 ORF of BPV 1.
Omikron-papillomavirus	Isolated from genital warts in cetaceans	E7 ORF absent Several larger unidentified ORFs located in L1 ORF region
Pi-papillomavirus	Isolated from hamsters Mucosal lesions	ELR absent with E2 and L2 ORFs partially overlapping.

^a ELR = region between the early and late genes of the papillomavirus genome.

^b Bravo and Alonso (submitted for publication).

(Tomada de De Villiers EM y cols, 2004)³³.

Las especies dentro de un género están relacionadas filogenéticamente, sin embargo pueden tener una gran diversidad biológica y los tipos dentro de una misma especie tienen propiedades biológicas y patológicas comunes (33).

La variación intratípica es de suma importancia, ya que puede llevar, aunado a factores propios del huésped, a alteraciones en la funcionalidad biológica y afectar por consecuencia el desenlace clínico de la infección (37). En el caso de las variaciones intratípicas, los virus más estudiados han sido el VPH-16 y el

VPH-18 debido a que son los que más comúnmente causan CaCU. Para VPH-16 se han descrito cinco grupos filogenéticos mayores, los cuales varían geográficamente y se conocen como rama Europea (E), Asiática (As), Asiático-americana (AA), Africana-1 (Af1) y Africana-2 (Af2). Existe una rama filogenética menor que se conoce como Norteamericana-1 (NA1) y la AA-G183/AA-c (38).

Se ha comentado en algunos reportes el hecho de que las variantes no europeas del VPH-16 se asocian con mayor frecuencia a lesiones de alto grado, lo mismo que en el caso del VPH-18, para las variantes no parecidas a la variante prototipo (NPL por sus siglas en inglés) (39, 40).

También existen reportes que sugieren que la variante AA pudiera tener mayor poder oncogénico que la variante E considerada como la variante de referencia se ha observado que la variante AA presenta cambios nucleotídicos en dos de tres elementos de respuesta a glucocorticoides/progesterona, por lo que esto podría explicar el encontrarla con mayor frecuencia en tumores de tipo adenoescamosos (41, 42).

Como se mencionó anteriormente, las variantes intratípicas presentan una distribución geográfica particular, siendo la más frecuente en la mayoría de continentes la variante E. Sin embargo, la variante AA se presenta únicamente en países de Centro y Sudamérica, así como en España, lo que puede explicar la mayor incidencia de CaCU en estos países (43). En México se ha reportado

que la variante del VPH-16 que se encuentra con mayor frecuencia es la AA y esto aunado a la pobre aceptación de los métodos de tamizaje que solo alcanzan a 30% de la población femenina adulta, pudieran explicar el porqué esta neoplasia es la principal causa de muerte por cáncer en nuestro país. Además, a diferencia de otros países en Latinoamérica, la variante más frecuente de la AA en México es la AA-c lo que refleja las diferencias étnicas entre los países (44).

Algunos autores han mencionado la diferencia oncogénica que varía además de acuerdo al origen étnico de la mujer infectada y es así como se reporta la posibilidad de que la distribución y persistencia de las variantes se puedan relacionar a la composición racial de la población que se encuentra en una determinada región geográfica. Existe un reporte donde se comenta que una infección por variantes europeas comparada con una causada por variante Af es menos probable de resolverse en mujeres blancas, pero más probable de resolverse en mujeres áfrico-americanas. También se ha reportado que es más probable la persistencia de la variante Af1 frente a la Af2 en mujeres áfrico-americanas. Esto da soporte al papel de la adquisición viral como explicación de la distribución geográfica asociada al componente racial en las variantes intratípicas (45). Así mismo, se sugiere que las diferencias asociadas a origen étnico también influyen no sólo en la persistencia de la infección, sino también en el desarrollo de lesiones intraepiteliales, como es el caso de las variantes europeas que se asocian más frecuentemente a lesiones de alto grado en

mujeres blancas que en mujeres de origen áfrico-americano, en el caso tanto de VPH-16 como de VPH-18 (46).

1.2.3.4 Herramientas moleculares de detección. Debido a la importancia que presenta el VPH como causa de lesiones premalignas y CaCU, se han dedicado tiempo y esfuerzo a la investigación de los mecanismos por los cuales este virus desencadena estas patologías y se han implementado numerosas herramientas para su detección. Sin embargo, no ha sido posible realizar estudios in vitro con este virus debido a su problema para crecerlo en cultivo, por lo que el estudio citológico e histológico de muestras cervicales solo revela las consecuencias de la infección viral y no determina la carga viral ni caracteriza al virus (47).

Actualmente existen dos tipos principales de metodologías para la detección del VPH, validadas en muchos estudios: los basados en hibridación sin amplificación previa [como lo es la captura de híbridos (HC). y los fundamentados en amplificación génica auxiliados por distintas metodologías para la tipificación posterior.

La FDA aprobó en el uso de la metodología conocida como captura de híbridos II (HC2) (Digene Corporation, Gaithersburg, MD), la cual se basa en la hibridación de sondas sintéticas de RNA complementarias a la secuencia de 13 virus de alto riesgo oncogénico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y cinco virus de bajo riesgo oncogénico (6, 11, 42, 43 y 44), preparadas en

dos reacciones distintas. El DNA presente en la muestra biológica se hibrida en solución con la mezcla de sondas de RNA, teniendo como resultado en caso de infección por VPH la formación de híbridos de DNA-RNA. Estos híbridos son entonces capturados por anticuerpos específicos adheridos a microplatos de titulación. Después de una serie de lavados para eliminar el exceso de anticuerpos y sondas no hibridadas, los híbridos inmovilizados en el microplato son detectados por una serie de reacciones que dan pie a la visualización de productos luminiscentes medidos por un luminómetro (48). La emisión de luminiscencia se da en unidades relativas y se toma como punto de corte una unidad, la cual equivale a 1pg de DNA viral por ml de amortiguador de muestra y corresponde a 5000 copias del DNA viral (49). El principal problema de esta metodología es la reactividad cruzada con tipos virales que no se incluyen en el juego de sondas de RNA, como lo son los tipos 53, 66, 67 y 73, así como con virus de bajo riesgo, lo que da lugar a resultados falsos positivos y disminuye la especificidad de la prueba. Otra desventaja consiste en que la HC2 no permite la tipificación del virus, solo distingue si se trata o no de un virus de alto riesgo, sin arrojar resultados específicos del tipo viral diagnosticado (48, 50).

Más recientemente se ha desarrollado un nuevo formato de este tipo de metodología conocido como captura de híbridos 3 (HC3). Esta herramienta se desarrolló para responder a la necesidad de aumentar la rapidez, así como la especificidad y sensibilidad del método previo en la discriminación entre blancos con similitud muy elevada. La especificidad está dada por el uso de oligonucleótidos biotinilados que capturan a los híbridos al estar unidos a una

superficie rica en estreptavidina. La señal es generada por sondas de RNA que se unen a otras regiones de los blancos. Esta herramienta es capaz de discriminar entre los VPHs 18 y 45, así como 16, 31 y 35, que están altamente relacionados. Existe además una nueva plataforma robótica para llevar a cabo la determinación de manera automatizada. Esta plataforma se conoce como Sistema de Captura Rápida (RCS) y está disponible para laboratorios que manejan un número muy elevado de muestras, de tal manera que es posible efectuar corridas por 3.5 horas sin necesidad de intervención humana, permitiendo la realización de la prueba a 352 muestras en un total de 8 horas (51).

Para conocer el tipo de VPH causante de una infección o lesión en cérvix, solamente se cuenta con la amplificación del genoma viral para posteriormente utilizar alguna técnica de resolución, como sería la electroforesis en gel, la hibridación reversa por puntos o líneas, cortes con enzimas de restricción, el uso de iniciadores específicos de amplificación y el estándar de oro, que es la secuenciación del DNA viral. El DNA del virus se puede amplificar selectivamente con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el uso de juegos de iniciadores específicos. La sensibilidad y especificidad de la PCR va a variar de acuerdo al juego de iniciadores utilizados, el tamaño del producto amplificado, las condiciones de reacción y el tipo de polimerasa empleada, así como la capacidad de la misma para detectar infecciones múltiples (48). Debido a las características intrínsecas de la reacción de PCR, su principal problema es el resultado de falsos positivos. Sin embargo, esto es fácil de solucionar al

introducir controles negativos a la reacción y en el caso de que estos resulten positivos, el resultado se invalida, siendo necesario repetir la reacción.

Dentro de los iniciadores más comúnmente utilizados se encuentran: MY09/11, GP5+/6+, PGMY09/11, HMB01 y SFP₁₀ que amplifican parte de la región L1 (47, 52). También se cuenta con los iniciadores CPI/Ilg que amplifican parte de la región E1 (53).

Los primeros iniciadores utilizados fueron los MY09/11, los cuales fueron diseñados basándose en regiones consenso de la región L1 de los virus conocidos en aquel entonces (VPH 6, 11, 16, 18 y 33). Se trata de un total de 24 iniciadores degenerados que logran amplificar no solo los cinco tipos virales con los cuales fueron diseñados, sino un total de 30 genotipos diferentes (54).

El iniciador HMB01 es derivado de estos iniciadores. A este último se le realizó un cambio para ser específico para el VPH tipo 51 (virus de alto riesgo) (55). La metodología más utilizada para correr la reacción con estos iniciadores es la descrita por Gravitt y cols en 1998, utilizando TaqGold como polimerasa en la reacción. Este mismo grupo en el 2000 diseñó un nuevo juego de iniciadores para amplificar la región L1 viral con mayor sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia. Lo llevaron a cabo basándose en la alta similitud de las secuencias virales reconocidas por los iniciadores degenerados MY09/11, resultando un total de cinco iniciadores específicos que se unen río arriba de la secuencia y trece iniciadores específicos para la región río abajo. Fue necesario disminuir la

concentración de magnesio debido a que estos iniciadores ya no cuentan con bases degeneradas y además se les llamó PGMY. Al comparar estos iniciadores con los anteriores utilizando las mismas muestras, se encontró una concordancia de 91.5% (Valor de concordancia kappa = 0.83). El sistema de iniciadores PGMY resultó tener una mayor sensibilidad al detectar 20 tipos virales más que el sistema MY. Además, los iniciadores PGMY fueron mejores para detectar infecciones múltiples (56). En el 2001, Coutlée y cols. realizaron un estudio para comparar los dos juegos de iniciadores antes mencionados utilizando 299 muestras genitales. Los amplicones generados por los PGMYs fueron tipificados por medio del ensayo de “line blot” y los amplicones derivados del uso de los iniciadores MY se tipificaron por sondas marcadas a través del ensayo de “dot blot”. Encontraron que el “line blot” de PGMY detectó la presencia de infección por VPH mucho más frecuente que con la metodología estándar (MY), incluyendo al VPH-16. La concordancia entre ambos ensayos fue de 84.3%, con un valor de kappa =0.69. Los VPHs tipo 45 y 52 fueron detectados más frecuentemente con los iniciadores PGMY que con los MY.

Los resultados discordantes entre las metodologías se debieron a muestras con infecciones múltiples. El tipo de Taq polimerasa usado en la reacción llega a ser de suma importancia, ya que existen reportes que demuestran mejor detección viral (así como detección viral en muestras con baja carga viral) al utilizar Taq-Gold en la reacción comparado con Taq polimerasa común (57).

La metodología más reciente que ha logrado una detección a partir de una sola copia viral es la PCR anidada, que utiliza como primer juego de iniciadores los PGMys y como iniciadores anidados los GP5+/6+. Strauss y cols. (2000) (Diagn. Mol. Pathol.;9(3):151-7) utilizaron la PCR anidada con los iniciadores MY09/11 – GP5+/6+, pero fueron Fuessel y cols. en el 2004 (J. Virol. Methods) quienes realizaron la comparación entre los dos tipos de PCRs anidadas, con lo que demostraron que el sistema a base de PGMY/GP+ logró detectar un VPH adicional por cada tres muestras estudiadas y cuenta con mayor capacidad para detectar infecciones múltiples. Aunado a esto, el sistema es capaz de detectar el genoma viral a partir de una sola copia, resultado que con el sistema MY/GP+ no es posible.

La importancia de utilizar estos tipos de herramientas moleculares de diagnóstico radica en el apoyo que pueden proporcionar al área clínica para brindar mejoras en los programas de tamizaje y de seguimiento en pacientes con tratamiento por lesiones premalignas, para la detección oportuna del CaCU.

1.2.4 Susceptibilidad.

1.2.4.1 Respuesta inmune ante la infección viral. Los organismos superiores tienen la capacidad de distinguir lo propio de lo que no lo es y establecer una reacción selectiva contra un gran espectro de antígenos extraños. Esta reacción se encuentra mediada por la compleja red interactiva de células y citoquinas celulares del sistema inmunitario y se conoce como respuesta inmunitaria (58).

Los factores genéticos desempeñan un papel tanto en la generación de la respuesta inmunitaria normal, como en el desarrollo de reacciones inmunitarias aberrantes y por tanto en la enfermedad mediada por la inmunidad (58).

Según se revisa abajo, la respuesta inmune ante la infección por el VPH, como en cualquier infección, es determinante para la eliminación de éste. Cualquier falla en alguno de los pasos desde el procesamiento y presentación antigénica, hasta la activación de la respuesta inmune adaptativa celular, puede llevar a la persistencia del agente infeccioso y desencadenar en la transformación celular, como es el caso del VPH cuando persiste en el epitelio cervical. Incluso una vez que existe transformación celular, la respuesta inmune anti-tumoral es prioritaria para evitar la formación de tumores invasivos.

Dentro de las primeras etapas se encuentra la presentación antigénica en donde el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC o HLA en humanos) juega un papel muy importante; ya que cualquier falla en las moléculas del HLA para presentar el antígeno puede llevar a la evasión de la respuesta inmune por parte del microorganismo. Así mismo, la existencia de fallas en los genes o en la expresión de moléculas estimuladoras, podrán llevar al mismo desenlace.

1.2.5 Aspectos inmunológicos implicados en la susceptibilidad.

1.2.5.1 Papel de la presentación antigénica en la respuesta inmune. Dentro de las principales funciones de los linfocitos T, destaca la defensa frente a este patógeno viral (VPH) y su participación en la activación de otras células del sistema inmune. Esto se encuentra dado principalmente por la interacción con dichas células a través de receptores antigénicos que reconocen antígenos en las células mencionadas (*Figura 1.3*). Como se ha mencionado previamente, la tarea de presentar antígenos corre a cargo de proteínas especializadas que son codificadas por genes presentes en el locus del MHC (59).

Existen células del sistema inmune encargadas de presentar los antígenos y activar así a los linfocitos T. Estas células expresan diferentes moléculas del MHC y se conocen como células presentadoras de antígenos (APC por sus siglas en inglés), dentro de las que se encuentran los macrófagos, los linfocitos B y las células dendríticas. Cada una juega un papel distinto en la presentación antigénica y al presentar los antígenos a los linfocitos T se desencadena la activación de la respuesta inmune adaptativa. Para despertar una respuesta inmune adecuada se requiere de una co-estimulación, es decir, además de la presentación antigénica es necesario que el linfocito T reconozca ciertas moléculas co-estimuladoras que se encuentran en las APC, como son B7.1 y B7.2.

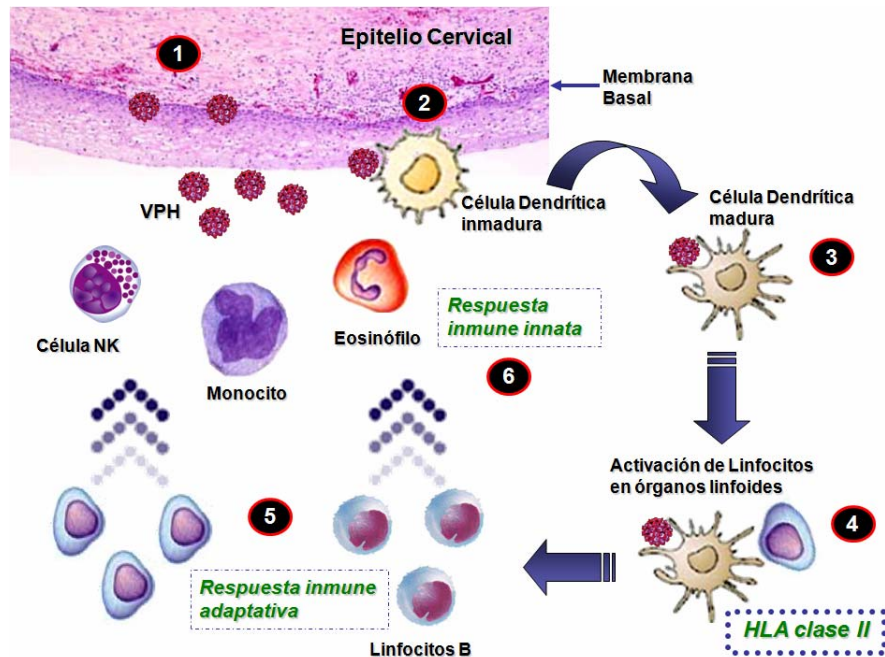


Figura 1.3. Presentación antigénica. 1-Infección del epitelio cervical por VPH. 2-Reconocimiento antigénico por las células dendríticas inmaduras que se encuentran cerca de la membrana basal. 3-Migración de células dendríticas maduras a órganos linfoides vecinos. 4-Activación de los linfocitos a través de la presentación antigénica por el complejo MHC clase II: péptido más moléculas co-estimuladoras. 5-Los linfocitos T y B activados (respuesta inmune adaptativa) migran hacia el sitio de infección. 6-Potenciación de la respuesta innata para ayudar al control y eliminación de la infección viral.

Por lo tanto, las APC son las únicas células capaces de iniciar una respuesta de células T, debido a que son las que cuentan específicamente con moléculas co-estimuladoras. Esto sirve como protección para el organismo al evitar así una autorrespuesta inmune (autoinmunidad). La presentación antigénica en ausencia de co-estimulación no sólo no produce activación de los linfocitos, sino que además lleva a anergia en donde las células T se vuelven refractarias a la activación. (60).

Las mejores APC son las células dendríticas debido a su alta capacidad para presentar un gran número de antígenos tanto a través de moléculas MHC clase I, como de clase II, jugando un papel muy importante en el procesamiento de partículas virales. El macrófago es incapaz de inducir co-estimulación y expresión de moléculas clase II del MHC y es aquí donde las células dendríticas llevan a cabo una función especial. Esto ocurre debido a sus características, ya que expresan niveles elevados de moléculas del MHC clase I y II, así como moléculas co-estimuladoras; así mismo expresan moléculas de adhesión como ICAM-1 y 2, LFA-1 y 3, lo que las hace aún más potentes para activar linfocitos T vírgenes (61).

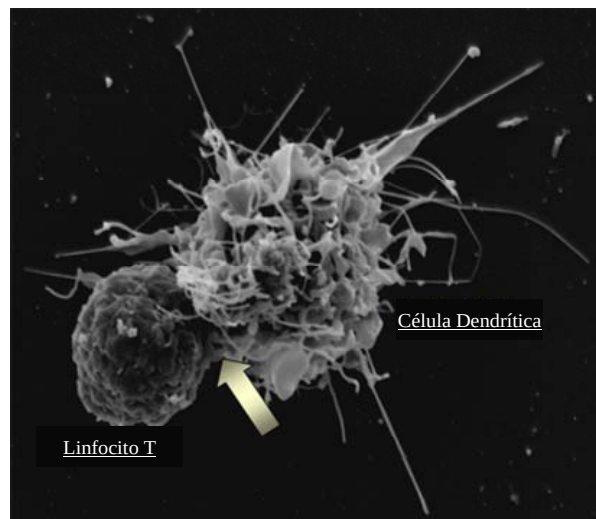


Figura 1.4. Interacción estrecha entre un linfocito T y una célula dendrítica. Se lleva a cabo para efectuar la presentación antigénica y la consecuente activación celular. El sitio de estrecha unión se conoce como zona de sinapsis inmunológica. (En línea)⁹³

Las células dendríticas pueden ser infectadas por una gran variedad de virus, por lo que son las encargadas de presentar los péptidos del VPH a los linfocitos T en el epitelio en donde son conocidas bajo el nombre de células de

Langerhan's (62). Al tener la capacidad de expresar ambos tipos de moléculas del MHC, las células dendríticas pueden llevar a cabo la activación tanto de células citotóxicas como de células reguladoras (TH1 y/o TH2) (*Figura 1.4*). Las proteínas de la cápside viral son translocadas dentro del retículo endoplásmico en donde se enfrentan a las moléculas MHC clase II y son presentadas por esta vía a los linfocitos T reguladores (CD 4) (62, 63).

Por lo mencionado anteriormente, resulta crucial la presentación antigénica, ya que una falla en esta o en la capacidad para reconocer los péptidos patógenos, llevaría a una nula actividad de la respuesta inmune que conduce a una replicación viral aumentada y finalmente a la transformación celular que conlleva al desarrollo del tumor.

1.2.5.2 El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC). Como se mencionó previamente, en los humanos el MHC es conocido también como HLA, por sus siglas en inglés de "Human Leukocyte Antigen". Se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 6 y está compuesto por aproximadamente 200 genes (64) que se extienden ocupando aproximadamente 4,000 Kb (*Figura 1.5*).

Más de cuarenta de sus genes codifican para antígenos leucocitarios y el resto son genes que no se encuentran evolutivamente relacionados con los propios genes del HLA, aunque algunos de ellos se encuentran relacionados funcionalmente (64). Los genes de este sistema son altamente polimórficos y de

hecho se les considera el sistema génico más polimórfico del genoma, contribuyendo a la gran diversidad de los organismos. Este sistema de antígenos fue descrito en la década de 1940 por George Snell, quien lo descubrió en ratones y encontró su importancia en el transplante de órganos. Además, en 1950 publicó las características que hacen a este sistema único, como son su alto grado de polimorfismo y su complejidad. En el ratón se conoce como sistema de histocompatibilidad 2 (H2) y otros autores fueron quienes agregaron, en humanos, la terminación LA al encontrar la participación de antígenos en leucocitos humanos.

Fue a principios de la década de 1970 que se le dio el nombre de MHC, al encontrar que este sistema descrito en ratones, tenía sus homólogos en otros vertebrados (65).

Ahora se sabe que el MHC se ha conservado a través de 500 millones de años, por lo menos en la región extracelular tanto de las moléculas clase I como de las clase II. Su organización está entonces altamente conservada y al parecer solo sufrió una desviación en el grupo de Teleósteos en el dominio $\beta 2$ de la clase II, en donde éste es codificado por 2 exones en lugar de 1. Se proponen dos posibilidades en la formación de la región que codifica para este dominio: 1) En los teleósteos probablemente el gen se duplicó en el mismo cromosoma y después se separó, 2) en los tetrápodos el gen pudo haberse duplicado en cromosomas diferentes y después se fusionaron (66). Sin embargo, aun no se

ha dilucidado cuál fue el mecanismo evolutivo exacto que sufrió este sistema para presentar dicha diferencia.

Actualmente existen reportados un total de 2,683 alelos distintos del MHC en general, de los cuales para clase I son 1,723, con 1,366 codificando para proteínas. Para la clase II existen 858 alelos distintos que codifican para 693 proteínas. Finalmente, existen 102 alelos no HLA que codifican para proteínas como TAP 1 y 2. Cabe destacar que la base de datos del número de alelos existentes a nivel mundial se actualiza cada tres meses con un aumento aproximado entre 50 y 80 alelos por cada actualización (67). Esto indica el gran número de alelos que rápidamente se van sumando a las cifras citadas.

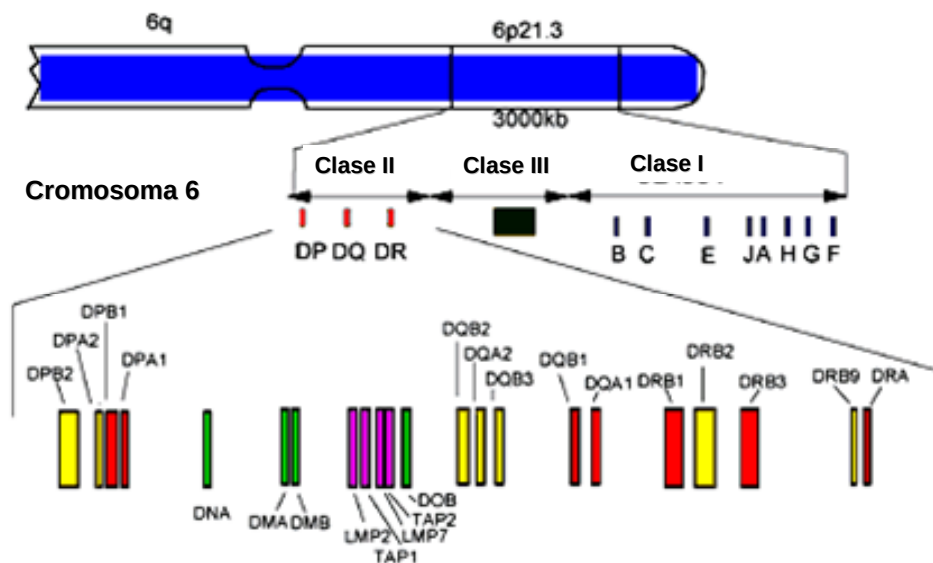


Figura 1.5. Ordenamiento de los genes del MHC en el cromosoma 6. Se observa la distribución de los genes más relevantes para cada locus del MHC, también conocidos como genes de la vía clásica del MHC. Del centrómero al telómero del brazo corto del cromosoma se encuentra primero a los genes correspondientes al MHC clase II, siendo los representativos el DP, DQ Y DR; seguidos de los de la clase III, los cuales no pertenecen al sistema inmune; y finalmente, proximal a la región telomérica se encuentran los genes de clase I, teniendo como genes representativos los designados como A, B y C. (En línea: www.medscape.com 2005)

Como se mencionó anteriormente, existen genes dentro del locus MHC que no están relacionados con la respuesta inmune, como son los genes clase III. Los que sí tienen que ver con la respuesta inmune y los antígenos leucocitarios se dividen en clase I y II, de acuerdo a su función y estructura. Los genes de clase I codifican para la cadena polipeptídica α de las moléculas clase I. La cadena β de estas moléculas está codificada por un gen que se encuentra fuera del MHC en el cromosoma 15. La cadena α tiene cinco dominios: 1 y 2 que corresponden a los dominios de unión a péptido, un dominio $\alpha 3$ que corresponde al tipo inmunoglobulina, una región transmembranal y una cola citoplasmática (*Figura 1.6*).

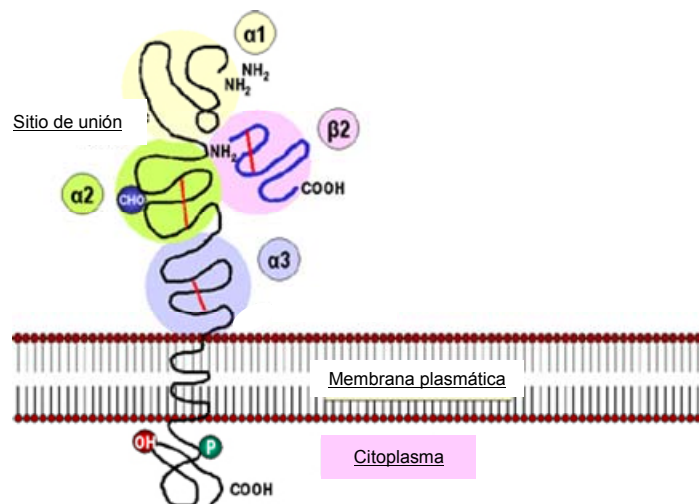


Figura 1.6. Molécula HLA clase I. Se muestran los dominios que conforman la molécula clase I, así como el sitio de unión y de anclaje a la membrana celular. (En línea)⁹⁴

Existen aproximadamente 20 genes, tres de los cuales se denominan HLA-A, B y C y se conocen como genes HLA clase I clásicos y son los principales en el ámbito inmunológico.

Los genes de clase II codifican tanto para polipéptidos α como β de las moléculas clase II. Todos se encuentran en el cromosoma 6 y sus loci se designan con tres letras: la primera (D) indica la clase, la segunda (M, O, P, Q o R) la familia y la tercera (A o B) la cadena (α o β , respectivamente) (*Figura 1.7*). Los genes individuales del sistema HLA se diferencian con números arábigos seguidos de otro número que indica la variante alélica, estos separados por un asterisco (*). Es decir, HLA-DRB1*0401 se refiere a la variante alélica 0401 del gen uno que codifica para la cadena β de la molécula clase II (D) que pertenece a la familia R (60).

Las moléculas de clase II cuentan con cuatro dominios: el dominio de unión al péptido, formado por las cadenas α_1 y β_1 ; el dominio tipo inmunoglobulina, formado por las cadenas α_2 y β_2 ; la región transmembranal; y el dominio correspondiente a la cola citoplasmática (60).

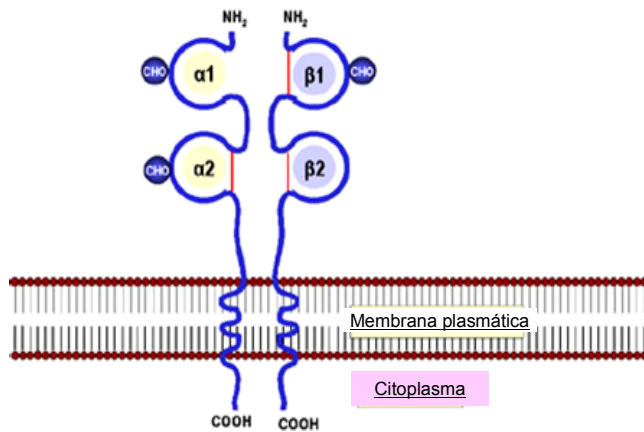


Figura 1.7. Molécula HLA clase II. Dominios de la molécula clase II. Dos sitios de anclaje a la membrana celular y dos dominios intracitoplasmáticos (En línea)⁹⁴

Los genes clase I son expresados por la mayoría de las células del organismo, a diferencia de los de clase II que sólo se expresan en células del sistema inmunológico (y algunas otras bajo el efecto de interferón- γ), como es el caso de las células B, los macrófagos, los linfocitos T activados, células dendríticas y células epiteliales derivadas del timo. Así mismo, ambas clases se diferencian en la clase de linfocitos T, a los cuales presentan péptidos. Las vías de procesamiento antigénico clásicas son distintas en ambas clases de moléculas HLA (60).

El ensamblaje de la cadena pesada y la de $\beta 2$ microglobulina para HLA clase I, se lleva a cabo en el retículo endoplásmico (RE) y antes de asignar el péptido a presentar, deben completar una serie de interacciones que incluyen moléculas accesorias y chaperonas para evitar el plegamiento prematuro, así como para asegurar una glicosilación adecuada (64).

En primer lugar se encuentra la calnexina que ayuda al plegamiento de la cadena pesada. Otra chaperona es la proteína de unión a inmunoglobulinas (BiP) que juega un papel similar en el ensamblaje de las cadenas en el RE. Al unirse ambas cadenas se puede liberar de las chaperonas antes mencionadas y unirse de esta forma a la calreticulina. La calreticulina es una proteína de fijación a calcio que se une únicamente a los dímeros de “cadena pesada:β2 microglobulina” formando un complejo. Este complejo interactúa con el transportador asociado al procesamiento antigénico (TAP) que se especializa en la traslocación de péptidos oligoméricos presentes en el citosol hacia el lumen del RE (69).

Los antígenos intracelulares que se encuentran en el citosol son procesados vía el proteasoma para digerirlos en péptidos que serán presentados vía las moléculas clase I del HLA. Una vez digeridos, los péptidos cruzan hacia el RE a través del canal TAP en donde son cargados en la hendidura de la molécula HLA clase I y a través de las vesículas del aparato de Golgi es presentado en la superficie celular (64).

En el caso de las moléculas HLA clase II, sucede algo similar inicialmente. Ambas cadenas son fabricadas de forma separada en el lumen del RE y es necesario que posteriormente se unan y se plieguen de forma adecuada con la ayuda de proteínas chaperonas. Sin embargo, en este caso las moléculas HLA no son cargadas con péptidos en el RE, sino que se unen a una proteína

luminal que funciona como freno para que las moléculas no unan péptidos indeseados (64). Esta proteína se conoce con el nombre de cadena invariable y se abrevia con las letras “Ii”. El complejo “MHC : Ii” es transportado a los compartimientos para MHC clase II (MIIC), en donde Ii es cortado por la cathepsina S y L y reducido a un remanente llamado péptido de la cadena invariable asociado a clase II (CLIP). La molécula CLIP, permanece unida a la hendidura de unión a péptido de la molécula clase II.

En el compartimento MIIC existe regulación de la unión del péptido a la molécula MHC clase II y se lleva a cabo a través de la molécula MHC clase II no clásica HLA-DM, la cual libera a CLIP del sitio de unión a antígeno y le da estabilidad a la molécula HLA que unirá el péptido para que lo haga con gran afinidad. Además, la molécula HLA-DM (DM) tiene la capacidad de remover péptidos que se encuentran unidos de forma inestable a la molécula.

Otra molécula no clásica, HLA-DO (DO) regula negativamente a DM de tal forma que la relación DO:DM puede servir como un indicador indirecto de efectividad en la presentación antigénica (68). Los antígenos que serán procesados generalmente entran a la célula por endocitosis a través de vesículas que se unen con otras para formar el lisosoma que contiene enzimas que degradan al antígeno para formar péptidos. Posteriormente, el lisosoma se fusiona al MIIC que transporta en su interior a la molécula clase II y al unirse es cuando los péptidos procesados son cargados en la hendidura de la molécula clase II para ser presentados en la membrana de la superficie celular (69). Se

sabe que existen otras vías de procesamiento antigénico en donde las moléculas clase I pueden contener péptidos derivados de proteínas endógenas y las moléculas clase II pueden presentar péptidos generados de síntesis endógena (como por ejemplo: proteínas virales) y se conocen como vías de procesamiento no clásicas (64).

A raíz de este conocimiento y estudios que asocian a las moléculas clase II con procesos tumorales (70, 68), es que el presente proyecto abarcó la investigación de alelos posiblemente asociados a susceptibilidad para la infección por VPH y el desarrollo de lesiones hacia CaCU.

1.2.5.3 Alelos de HLA asociados a la enfermedad. Estudios sobre a HLA clase II y CaCU ha demostrado que los alelos DQB1*030X (90) y el haplotipo DRB1*1501/DQB1*0602 (71, 72), que se encuentra en desequilibrio de ligamiento, parecen contribuir un riesgo elevado para el desarrollo de neoplasia intraepitelial. Por otro lado, el haplotipo más comúnmente asociado con disminución en el riesgo para desarrollar la enfermedad es el DRB1*1301-5/DQB1*0603 (71).

Los resultados más consistentes han sido para los alelos DRB1*13 y DQB1*0603, los cuales en diferentes estudios arrojaron el mismo resultado en un 95% del total de datos reportados en la década de 1991 a 2001 (71). Para los alelos DQB1*030X, se encontraron resultados similares en 59% de los estudios realizados en la misma época en poblaciones caucásica, europea y

estadounidense. Sin embargo, no se encontraron asociaciones de estos alelos en poblaciones de Centro y Sudamérica o en África (71).

El haplotipo DRB1*1501/DQB1*0602 fue reportado por primera vez en población hispano-estadounidense, asociado a carcinoma invasor con un riesgo (razón de momios OR) de 2.9 (72).

A pesar de estos reportes, existen muchos otros que no encontraron asociación alguna entre estos alelos y/o haplotipos y la enfermedad. Por el contrario, existe un reporte que data de 1998, en donde refieren al haplotipo DRB1*1501/DQB1*0602 como protector ante la enfermedad, con un riesgo (RR) de 0.42 y un intervalo de confianza (IC) de 0.21 - 0.83 (73).

En población hondureña, por ejemplo, se encontró que el alelo DQB1*0602 resultó ser protector ante el desarrollo de lesiones intraepiteliales, comparando grupos de mujeres infectadas con los virus tipos 16 ó 18 con un RR de 0.34 y $p=0.03$ (74).

En población mexicana existe solo un reporte de los años de 1990 a la actualidad, en el que estudian los alelos del MHC y su asociación con cáncer cérvicouterino, el cual fue realizado por métodos serológicos y encontraron asociación positiva entre HLA-DR5 y cáncer invasor con un OR = 3.34 e IC de 1.5 a 7.55; no así para alelos del locus HLA-DQ (75).

En años más recientes se ha continuado la investigación en cuanto a las moléculas HLA y su asociación con CaCU.

Por lo descrito anteriormente, es posible observar que la distribución de alelos del MHC varía entre poblaciones, al igual que la evidencia sobre la asociación entre alelos de este locus y el riesgo de progresión de la enfermedad por infección del VPH.

1.2.5.4 Herramientas moleculares para la tipificación de los alelos de HLA.

La complejidad del MHC ha requerido de explorar numerosos métodos para la tipificación molecular de sus alelos específicos. El poder determinar cual es el par de alelos que residen en un locus ha constituido un reto.

En años anteriores se utilizaban métodos serológicos dependientes de complemento y basados en citotoxicidad. Sin embargo, no todos los productos génicos son diferenciados por serología, por lo que se han desarrollado nuevas metodologías basadas en la genotipificación por métodos de ADN.

Dichas tipificaciones se puede realizar a diferentes niveles de discriminación alélica clasificándose entonces como de resolución baja, intermedia y alta. La tipificación serológica utilizada con anterioridad (microlinfotoxicidad) corresponde a discriminación de baja resolución y sirve para definir familias alélicas únicamente. La resolución intermedia sirve para determinar si un paciente presenta un alelo de un grupo establecido por baja resolución y para

eliminar otras posibles opciones (76). Dentro de los métodos de resolución intermedia se encuentra la amplificación mediante PCR y su análisis por dos métodos: a) sondas de oligonucleótidos de secuencia específica (SSOP, por sus siglas en inglés) y b) iniciadores de secuencia específica (SSP, por sus siglas en inglés).

El SSOP consiste en detectar diferentes alelos en un mismo locus utilizando sondas que reconocen las diferencias alélicas y se unen por complementariedad (hibridación). La hibridación se puede llevar a cabo inmovilizando los amplicones a una membrana y marcando las sondas a hibridar, lo que es conocido como el tradicional “dot blot”. Si en lugar de puntos, los amplicones se observan como una línea entonces se le da el nombre de “slot blot”. Al contrario, si las sondas son las que se inmovilizan en la membrana y los amplicones son marcados al momento de la amplificación entonces se le da el nombre de “dot blot reverso”. Existen estuches comerciales que incluyen los iniciadores marcados, así como las membranas con las sondas inmovilizadas listas para llevar a cabo la hibridación. (76, 77)

En la SSP, la amplificación de los alelos en un locus se lleva a cabo con iniciadores de secuencia específica y la detección se lleva a cabo en un gel de agarosa de acuerdo al fraccionamiento de los productos en el mismo. La mayoría de los estuches comerciales para este tipo de detección cuenta con un set de iniciadores en reacciones separadas para la tipificación de varios alelos en un locus. Dependiendo de los iniciadores utilizados, se puede obtener

resolución intermedia o alta, sin embargo para una alta resolución es necesario utilizar previamente otra metodología o el mismo SSP, pero con un juego de iniciadores más generales al inicio. (76, 78).

Para conocer cual es el alelo específico que se encuentra en un locus es necesario utilizar un método de alta resolución como es el caso de la tipificación basada en secuenciación (SBT por sus siglas en inglés). Esta requiere de una amplificación inicial del locus en cuestión. El tamaño del amplicón varía dependiendo del locus a amplificar. Para HLA clase I el amplicón comprende del exón 1 al exón 5; para HLA clase II es suficiente amplificar el exón 2 debido a que es suficiente para conocer el par de alelos con el que cuenta la persona. Al contar con el amplicón inicial se procede a purificar el producto para eliminar el exceso de nucleótidos de la reacción para que la secuenciación sea adecuada. Para la reacción de secuenciación se usa el templado para las reacciones río arriba y río abajo para el exón 2 y 3 y en ocasiones para el exón 4. Para HLA clase II se opta por obtener la secuencia el exón 2 completo. Los productos una vez purificados se cargan en el secuenciador y posteriormente se utiliza software especial para que a partir de la secuencia nucleotídica obtener la identificación de los alelos. Si los datos obtenidos son de excelente calidad, la identificación será muy sencilla y solo requerirá un análisis más detallado para aquellos datos en donde se necesite identificar heterocigocidad alélica. En el caso de HLA clase II será necesaria en algunas ocasiones la secuenciación del codón 86 para eliminar las ambigüedades (79).

1.2.6 Biomarcadores.

Según la definición ya clásica de McCarthy & Shugart (1990), los biomarcadores son "medidas en los niveles molecular, bioquímico o celular, tanto en poblaciones naturales provenientes de hábitats contaminados, como en organismos expuestos experimentalmente a contaminantes, que indican que el organismo ha estado expuesto a sustancias tóxicas y la magnitud de la respuesta del organismo al contaminante" (80).

Se la han asignado múltiples usos a los biomarcadores, sobre todo en cáncer, además de enfermedades como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso, entre otras. Los biomarcadores deben poseer ciertas características, como son la reproducibilidad, sensibilidad, especificidad, aplicabilidad en diversos taxones, facilidad de uso y adecuada relación costo/efectividad (80). Una reproducibilidad aceptable con un coeficiente de correlación elevado entre dos ensayos diferentes, es insuficiente para garantizar la reproducibilidad de un biomarcador. Es necesario, además, validar el procedimiento completo, desde el procesamiento de la muestra, hasta la medición e interpretación de los resultados. Cabe destacar que los mejores biomarcadores son aquellos que aumentan el valor predictivo positivo y que en su caso, ayudan a disminuir el sobre-tratamiento de los pacientes (81)

En el 2004 se formó el Consorcio Internacional de Biomarcadores en Cáncer (ICBC) con participación de diversos países como USA, Corea, Canadá, Japón, Hong Kong, China, Taiwán y Singapur. El ICBC cuenta con un gran número de

miembros expertos divididos en dos grupos: el comité de dirección y el comité de expertos en biomarcadores. Dentro de los temas en donde se enfoca la investigación de este consorcio se encuentran hasta ahora el cáncer de mama, ovario, estómago, nasofaringe, páncreas e hígado. El objetivo de esta organización es sumar esfuerzos en el campo de la proteómica para lograr un avance efectivo a corto plazo en la búsqueda de biomarcadores en cáncer (82).

Uno de los biomarcadores de mayor uso en la investigación actual es el ensayo con microarreglos para medir expresión de genes. El perfil de expresión de genes es una herramienta muy poderosa para identificar y registrar marcadores asociados a enfermedades o para vigilancia de respuesta a cierto tratamiento (83). Utilizando esta herramienta es también posible la identificación de genes candidatos que funcionen como marcadores de enfermedad, como en el caso de Ki-67 para el CaCU (84).

Para la epidemiología molecular existen biomarcadores para cáncer, los cuales se dividen en diferentes clases como son: marcadores de exposición (ej. presencia del virus), de dosis (ej. carga viral), de dosis efectiva biológica (ej. número de mutaciones o polimorfismos en p53 y otros supresores de tumores), de alteración en función y/o estructura (ej. inestabilidad cromosómica), de susceptibilidad (polimorfismos, microsatélites o cambios en patrones de expresión de genes relacionados), de subtipos de cáncer y de pronóstico (85). Los marcadores moleculares podrán ayudar a diferenciar entre pacientes con mayor riesgo de progresión hacia CaCU. Es así como en la actualidad se

conoce una gran diversidad de marcadores moleculares en esta enfermedad. Dentro de los más comunes y de mayor utilidad se encuentran la carga viral, los marcadores de proliferación (p16 (INK4A), Ki 67, ciclinas, inhibidores dependientes de ciclinas (CDK), antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), proteínas de mantenimiento de minicromosomas (MCMs), cambios epigenéticos (metilación de genes como Caderina-E), telomerasa y los alelos del Complejo Principal de Histocompatibilidad (HLA) (86).

El análisis de polimorfismos de un sólo nucleótido constituye otro tipo de biomarcador que ha sido de mucha utilidad para el estudio de la susceptibilidad genética en el CaCU. Calhoun y cols. estudiaron en el 2002 un total de 127 muestras de CaCU y las compararon con 108 muestras de donadores sanos. Realizaron la genotipificación de 12 polimorfismos en sangre venosa periférica por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación directa. Estos polimorfismos se ubicaban en genes relacionados con la respuesta inmune como TNF-alfa, en el receptor de IL-4, en p53 y NRAMP1 y encontraron que el genotipo heterocigoto para la mutación estudiada en NRAMP1 (region 3'-no traducida) se asoció negativamente con CaCU, al igual que con la mutación -376 estudiada en TNF-alfa.

1.3 Justificación

El CaCu es sin duda un grave problema de salud pública en México, ya que es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, con un deceso cada dos horas. El impacto en los últimos meses ha ido en aumento en el estado de Nuevo León, ya que la incidencia de esta enfermedad no sólo no ha sido disminuida, si no que por el contrario ha aumentado en la primera mitad del año 2006. No existen en nuestra población estudios donde se hayan integrado factores epidemiológicos, clínicos y moleculares con el deseo de identificar mujeres con mayor riesgo de progresión a CaCU. Este proyecto cuenta con el potencial de encontrar asociaciones con significado estadístico entre los diversos factores ya mencionados, para ayudar al entendimiento de la fisiopatología de esta enfermedad tan importante en México y el mundo.

Se ha avanzado importantemente en el estudio del VPH y su asociación con CaCU. También se ha observado que cada población cuenta con factores de riesgo característicos y la incidencia de la enfermedad varía de un país a otro. Con este estudio esperamos encontrar factores epidemiológicos y moleculares, tanto virales como del huésped, asociados a la progresión de la infección con VPH que ayuden a identificar alelos del HLA que nos permitan distinguir, junto con otros biomarcadores, a las pacientes que se encuentren en el grupo de alto riesgo para desarrollo de lesiones intraepiteliales y CaCU y con esto mejorar la detección y el tratamiento oportunos, sobre todo en etapas tempranas de la infección. En cuanto a la asociación de los alelos del HLA con la persistencia de la infección por VPH, ésta varía dependiendo de la población o grupo étnico, por lo que es importante determinar en las distintas poblaciones cuales son los

alelos asociados a la enfermedad, principalmente en poblaciones con alto riesgo para el desarrollo de cáncer, como en la nuestra.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1 Objetivo general.

Practicar una segunda visita a mujeres aparentemente sanas que fueron positivas para VPH en el 2002 para continuar el seguimiento clínico e investigar el papel de la persistencia viral y de los alelos de HLA en la progresión de lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado hacia CaCU.

2.2 Objetivos específicos.

- a. Re-examinar la presencia del VPH en pacientes que presentaron infección por este virus en el 2002.
- b. Determinar el porcentaje de persistencia/recurrencia de infecciones por VPH.
- c. Re-examinar cuales tipos de VPHs son los más prevalentes en el grupo de estudio.
- d. Determinar los co-factores de riesgo para la progresión de la infección por VPH.
- e. Tipificar los alelos del HLA clase II DQB1 en los grupos de estudio y determinar cuales pudieran estar confiriendo riesgo o protección para la persistencia de la infección por VPH.

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Lugar de realización del estudio.

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Genómica y Bioinformática del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL, en conjunto con el Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio Gonzalez”, el área de Salud Reproductiva de la Secretaría de Salud del Estado y con apoyo del Centro Universitario contra el Cáncer.

3.2 Grupo de estudio.

Se partió del grupo de 600 mujeres positivas para la infección por VPH en el 2002, siendo la positividad para la infección en ese año el criterio de inclusión utilizado. Se les explicó ampliamente en lo que consistía el proyecto de investigación y se les pidió que leyeran y firmaran la hoja de consentimiento informado logrando re-evaluar un total de 197 pacientes de este grupo (Anexo II). El seguimiento se realizó en el período comprendido entre los años 2005 – 2006, tanto en el Departamento de Ginecología como en los Centros de Salud de la Secretaría del Estado. Del total de 197 pacientes re-evaluadas, se excluyeron y eliminaron un total de 9 pacientes por DNA insuficiente o cursar

con embarazo al momento de la evaluación. Tomando para el análisis un total de 188 pacientes las cuales se dividieron en dos grupos, de acuerdo a la positividad del VPH, para llevar a cabo el análisis de los objetivos.

3.3 Material y reactivos.

3.3.1 Materiales:

Los tubos cónicos, guantes de látex y puntillas utilizados fueron adquiridos en Cell Associates, TX. E.U.A.

Los cepillos vaginales y tubos vacutainer se adquirieron en DM, S.A. de C.V., México, D.F. y Becton Dickinson and company, NJ, E.U.A. respectivamente.

Las criocajas de polipropileno se adquirieron en Daigger Lab Equipment and Supplies, E.U.A.

3.3.2 Reactivos:

El SDS, Fenol, Tris-EDTA y Acetato de amonio fueron adquiridos en Sigma Chemical Company, MO, E.U.A.

Las solventes orgánicos (Cloroformo, Etanol y Isopropanol), así como el ácido acético fueron de la marca Merck de México.

La Proteinasa K, la Kanamicina, la enzima Superscript III y el vector Topo TA Cloning fueron adquiridos en Invitrogen corporation, E.U.A.

La peptona, extracto de levadura, agar y cloruro de sodio se adquirieron en Spectrum. CTR, México.

El Precervcyt se adquirió en Cytex Corporation, MA, EUA., el estuche de detección Amplicor VPH fue de la marca Roche Inc. El estuche de secuenciación SequiTherm Excel II de la Li-Cor Biosciences, Inc. NE, E.U.A.

El estuche comercial INNO-LiPA HLA-DQB1 fue adquirido en Innogenetics, NV, Belgium.

La agarosa se adquirió en Amresco, Ohio, EUA. y el RNAqueous-4PCR para extracción de RNA de Ambion, St Austin, Tx, E.U.A.

3.4 Equipo.

Los equipos Mastercycler gradient, Thermomixer 5436, Centrífuga 5702 R y Microcentrífuga 5412 fueron adquiridos en Eppendorf, Hamburgo, Alemania.

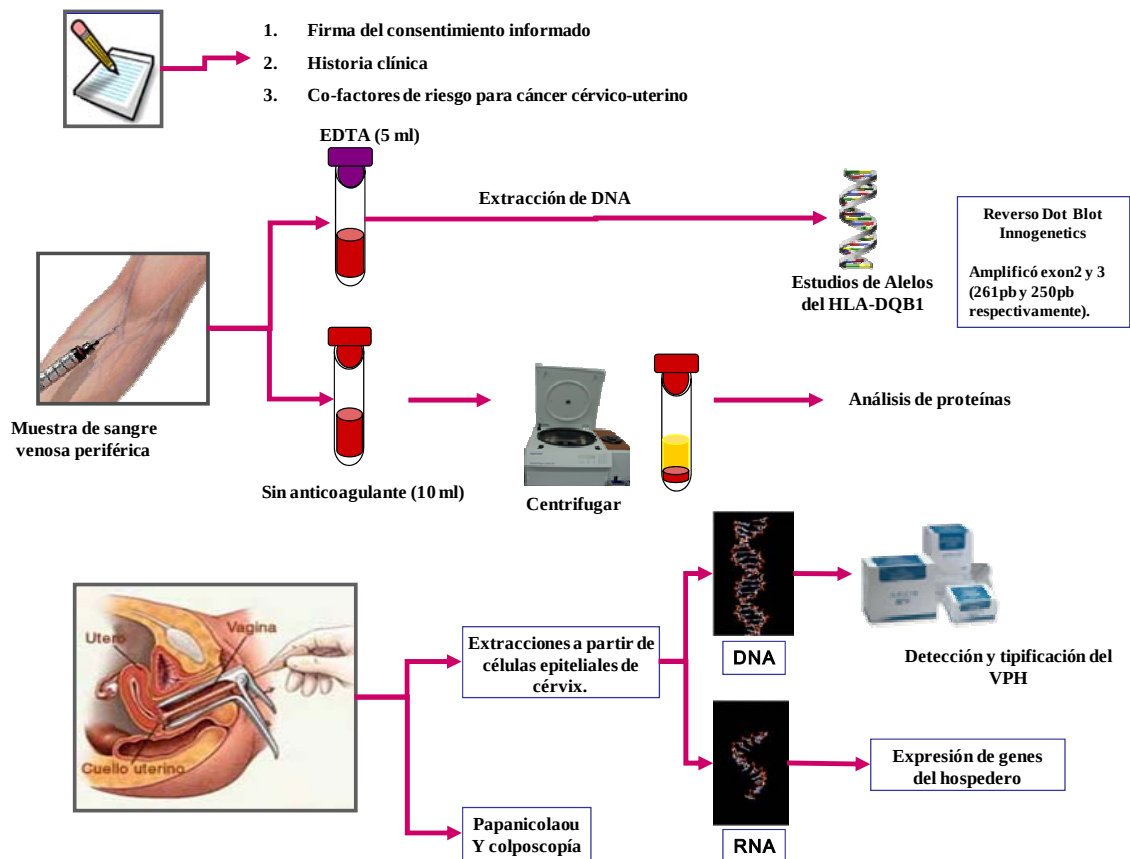
La centrífuga TJ6 fue de la marca Beckman, Dubuque, Iowa, E.U.A. La balanza granataria 1206 de Saetorius MP, Alemania. Termociclador PTC-100 de MJ Research, NJ, E.U.A.

La cámara de electroforesis se adquirió en Fotodune, Hartland, Wi, E.U.A. El Baño con control de temperatura de la marca Lab-line Instruments Inc. IL,

E.U.A. La Fuente de poder 250 marca Gibco-BRL, MD, E.U.A. El Vórtex 37600 de Thermolyne, Iowa, E.U.A.

Se utilizó un Fotodocumentador marca Gel Doc 1000, Ca, EUA. Una incubadora 1535 de Sheldon Manufacturing, Inc. EUA. Y por último una campana de luz UV 95036701 marca UVP, Inc. E.U.A.

3.5 Estrategia general.



3.6 Métodos.

3.6.1 Procedimientos para el estudio epidemiológico.

Para evaluar los factores de riesgo epidemiológicos y sociales a los que las pacientes se han expuesto, se realizó una encuesta a las pacientes que se vieron en los diferentes centros de salud de la Secretaría de Salud del Estado, en la cual se tomaron en cuenta las siguientes variables: edad, estado civil, grado de escolaridad, ocupación, número de parejas sexuales, edad de inicio de vida sexual, uso de métodos anticonceptivos, consumo de tabaco, alcohol, drogas, consumo de vitaminas del complejo B, paridad, edad al primer embarazo, antecedente heredofamiliar de CaCU y grado de conocimiento del estudio citológico (Anexo III).

3.6.2 Procedimientos para el estudio clínico gine-histopatológico.

A todas las pacientes se les realizó una exploración ginecológica completa con toma de citología y estudio colposcópico, el cual fue efectuado por el Servicio de Ginecología-Oncológica del Departamento de Ginecología del Hospital Universitario “Dr. José E. González” y por el Servicio de Colposcopia de la Secretaría de Salud del Estado de Nuevo León. La toma de biopsia se indicó en caso de observar una colposcopia sospechosa de lesión, como podría ser: aspecto de mosaico, punteado grueso, áreas de leucoplasia de amplio grosor y bordes espicados y vasos atípicos irregulares de acuerdo a la clasificación de Coppleson (When to suspect cáncer at colposcopy, Wright V. Cecil, Nurse pract 2001 Sept;26(9):50-6,59-61). Todos los estudios histopatológicos se realizaron en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”. Las mujeres con lesión intraepitelial de alto (HSIL) o bajo (LSIL) grado o CaCU, fueron remitidas sin demora para tratamiento.

3.6.3 Análisis genético.

Se realizaron tomas de cepillado cervical para extracción de DNA y RNA, así como de sangre periférica (15 ml) para extracción de DNA y almacenaje de suero. El propósito fue crear un banco de muestras de mujeres con persistencia o eliminación de la infección por VPH, así como de mujeres con lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado o CaCU.

3.6.4 Detección y tipificación del VPH.

La detección y tipificación del VPH a partir de muestras de cepillado cervical se realizó en el laboratorio de Genómica y Bioinformática del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL.

A partir de las muestras cervicales colectadas en medio de conservación, se realizó la extracción de DNA con la técnica de digestión con proteinasa K, precipitación con etanol y resuspensión en TE (10 mM Tris-HCl, pH8 y 0.1 mM EDTA).

Se detectó y tipificó el VPH a partir de DNA viral extraído de células cervicales utilizando el estuche comercial “Amplicor HPV” (Roche). La detección consistió en la amplificación de una región de L1 del genoma viral de aproximadamente 450pb, utilizando los iniciadores específicos PGMY 09/11(Roche) y como control interno se usó el gen de la β -globina con los iniciadores incluidos en el estuche comercial. Los iniciadores PGMY 09/11 consisten en un “pool” de iniciadores específicos para la detección de aproximadamente 37 tipos diferentes de VPH.

Las condiciones de PCR utilizadas fueron: desnaturalización a 95°C por 12 minutos seguido de 40 ciclos consistiendo cada uno de desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento de iniciadores a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min. Al final de los 40 ciclos, se incluyó uno de extensión a 72°C por 5 min (Roda Husman y cols 1995, Van den Brule y cols 2002).

La tipificación se lleva a cabo por hibridación reversa del producto amplificado con sondas de DNA específicas adheridas a tiras colorimétricas de nylon, las cuales están incluidas también en el estuche comercial previamente mencionado (Roche). La identificación se realizó utilizando una plantilla incluida en el mismo.

Se tomaron los resultados de las muestras que fueron positivas para β -globina. En caso de no dar positividad para β -globina se repitió el análisis con el doble de cantidad de templado y de continuar negativas se realizó PCR anidada utilizando los iniciadores GP5+/6+, que dan como amplicón un producto de 195 pb. Esto para evitar resultados falsos negativos, y se realizó como se menciona a continuación.

3.6.5 PCR anidadas para muestreo de los resultados negativos para VPH.

En caso de no coincidir el resultado histopatológico con el estudio genético de detección y tipificación de VPH, se procedió a realizar una PCR anidada del virus utilizando como templado el producto amplificado de 450pb obtenido usando los iniciadores PGMY 09/11, para confirmar los resultados.

La región del virus de interés se amplificó mediante la PCR anidada utilizando los iniciadores GP5+ (5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3') y GP6+ (5'-

GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3'), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 95°C por 12 minutos seguido de 40 ciclos consistiendo cada uno de desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento de iniciadores a 43.5°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min. Al final de los 40 ciclos, se incluyó uno de extensión a 72°C por 5 min (Jacobs M.V. y cols 1995).

Las reacciones se corrieron en geles de agarosa al 2%, considerándose positivas aquellas con un producto esperado de 195 pb. Para la tipificación de estos virus fue necesario realizar la secuenciación del producto obtenido, clonando primero en el vector Topo de Invitrogen. Para esto último se incubó por 5 min con el vector para posteriormente incubar con células calciocompetentes por media hora y plaqu coastar en agar con kanamicina. A las 12 hrs se picaron colonias para crecerlas en medio de cultivo LB por 12-18hrs a 37°C y se realizó la minipreparación para extraer DNA plasmídico, detectar y caracterizar a los candidatos para llevar a cabo la reacción de secuenciación como lo reportan Jacobs M.V. y cols. 1997.

3.6.6 Tipificación de alelos DQB1 del complejo principal de histocompatibilidad clase II (HLA clase II).

Para el análisis genético del HLA se tomó una muestra de 5 ml de sangre venosa periférica (SVP) anticoagulada con EDTA. A partir de ésta se realizó extracción de DNA genómico con la técnica TSNT-SEVAG. Para la precipitación se utilizó etanol al 100% (Merck). Para la tipificación de alelos DQB1 del HLA clase II, fueron empleados como sustrato 600 - 800 ng/μl de DNA genómico de sangre periférica para la técnica de PCR con iniciadores

específicos del estuche comercial de Innogenetics para amplificar el exón 2 (261 pb) y el exón 3 (250 pb) pertenecientes al locus del MHC clase II DQB1 en los grupos de estudio.

En una primera parte se realizó la amplificación del locus correspondiente bajo las siguientes condiciones de PCR (en un volumen total de 20 µl en el termociclador Perkin-Elmer con tapa caliente): etapa inicial de desnaturalización a 95°C por 5 min., segunda de treinta y cinco ciclos integrada cada uno por tratamientos consecutivos de desnaturalización a 95°C por 20 seg, alineamiento a 58°C por 20 seg y polimerización a 72°C por 20 seg. También aquí se incluyó una etapa de extensión a 72°C por 10 min. Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 2% para ser visualizados por tinción con bromuro de etidio en un fotodocumentador.

Posteriormente se realizó la técnica de Dot Blot Reverso para la tipificación de los alelos a partir de los productos amplificados previamente. La técnica es una variación del Dot Blot tradicional, en la cual las sondas a emplear para la tipificación se encuentran inmovilizadas sobre una tira de nitrocelulosa. Después de realizar la PCR genérica de locus usando iniciadores marcados con biotina, se procedió a desnaturalizar las cadenas del DNA del producto amplificado empleando una solución de hidróxido de sodio. El DNA desnaturalizado se incubó por 30 minutos a 56°C en presencia de la solución de hibridación con las sondas que se encuentran en la membrana y después de tres lavados con solución astringente y solución de lavado se procedió a la detección de la hibridación mediante un método colorimétrico, incubando a temperatura ambiente por 30 minutos en presencia de solución de conjugado

que contiene estreptavidina y fosfatasa alcalina. Se realizaron dos lavados después de incubar con el conjugado y se procedió a agregar la solución del sustrato de la enzima, incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos para el desarrollo de color en aquellos casos donde se llevó a cabo la hibridación. Finalmente, se lavaron las membranas y se interpretaron los resultados considerando la línea como positiva en aquellos casos en donde aparecía una banda de color púrpura claro o marrón. Las líneas positivas se leyeron con una plantilla y el número de cada sonda positiva se introdujo en el software de análisis (Liras por Lipa) que provee la compañía.

3.7 Análisis estadístico.

Se realizó estadística descriptiva para los datos epidemiológicos utilizando el paquete estadístico Epi Info versión 5. Se calcularon prevalencias para los tipos de VPHs encontrados con el paquete SPSS versión 10. Para el análisis de las asociaciones entre la enfermedad y los alelos de HLA, se comprobó que existiera equilibrio alélico de los mismos en los grupos de estudio y posteriormente se calcularon las frecuencias alélicas y génicas, así como las razones de momios para cada alelo y se realizó prueba de χ^2 para buscar asociaciones, en el caso de contar con celdas con valores menores a cinco se realizó Prueba exacta de Fisher; todo lo anterior se realizó con los paquetes Epi Dat versión 5 y RxC versión 2.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

Se examinaron un total de 197 pacientes de las cuales se excluyeron nueve porque no fue posible aislar DNA de óptima calidad para la amplificación y detección del genoma viral. De las 188 mujeres incluidas en el análisis, se encontró una edad promedio de 40.3 años ($DE \pm 11.2$ años). Todas las pacientes eran residentes del área metropolitana, siendo el 55.9% originarias de Nuevo León. El 44.1% restante presentaron un promedio de 30.4 años ($DE \pm 11.9$ años) residiendo en el estado, siendo la mayoría (40.2%) originarias del estado de San Luis Potosí.

4.1.1 Detección viral.

Al total de pacientes se les realizó la detección y tipificación molecular del VPH, en donde se encontró un total de 52 mujeres positivas para la infección cervical por VPH (casi 28%, tomando tanto las infecciones sencillas como las múltiples) (*Figura 1*).

Al realizar la detección del tipo viral por la técnica de hibridación reversa, se encontró que infecciones múltiples (más de un tipo viral) se presentaron en el 6.9% tomando la población total de estudio (*Figura 4.1*).

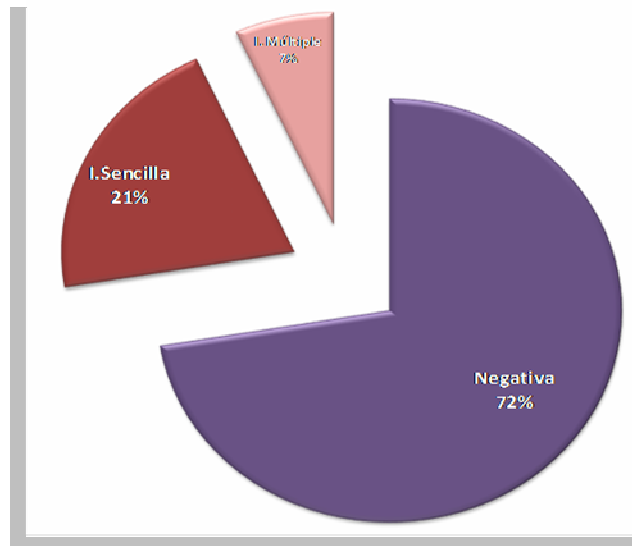


Figura 4.1. Detección del VPH y tipo de infección. Se realizó la detección viral con la técnica de PCR con juegos de iniciadores para 27 tipos virales diferentes. Se puede observar como el 28% (21% más 7% de infección sencilla y múltiple respectivamente) de la población en general presenta infección con algún tipo viral. Se detectó más de un tipo viral infectando en la misma muestra en un 7% de los casos, frente a un 21% de infección por un solo tipo viral.

Se encontró que el 61.5% de las infecciones eran causadas por virus de alto riesgo oncogénico, 30.8% por los de bajo riesgo y 7.7% por aquellos de riesgo desconocido o no clasificado aun (*Figura 4.2*).

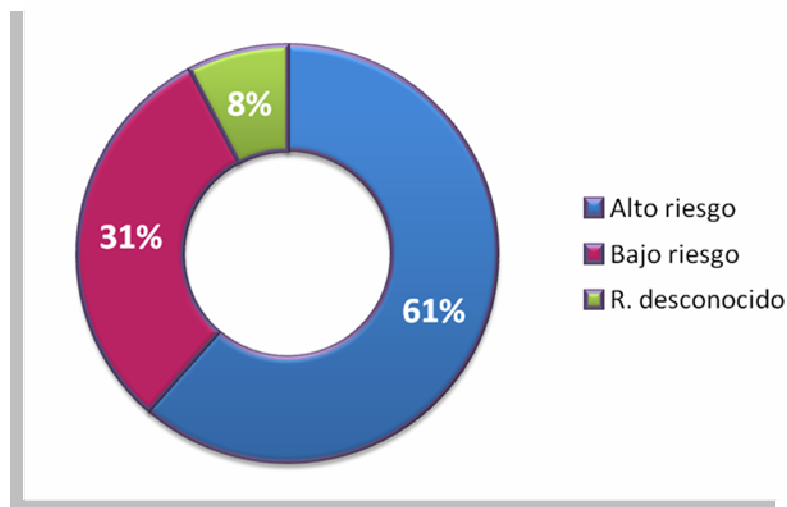


Figura 4.2. Incidencia según el grado de riesgo oncogénico viral. Se observa la distribución de los tipos virales de acuerdo a su grado de riesgo para desarrollar lesiones y/o CaCU. Se observa que la mayoría de virus detectados fueron de alto riesgo oncogénico.

4.1.2 Prevalencia viral.

Así mismo, al realizar la tipificación por hibridación reversa, fue posible detectar que el virus de mayor prevalencia dentro de las pacientes positivas para la infección fue el VPH-83 (14.8%), seguido del 62 (13.6%), el VPH-39 (7.4%), el 16 y 84 (6.2% cada uno). En sexto lugar de prevalencia se encontró el VPH-18 (4.9%) y con el mismo porcentaje de prevalencia que este último se encontraron los VPHs-52, 56 y 61 (*Figura 4.3*).

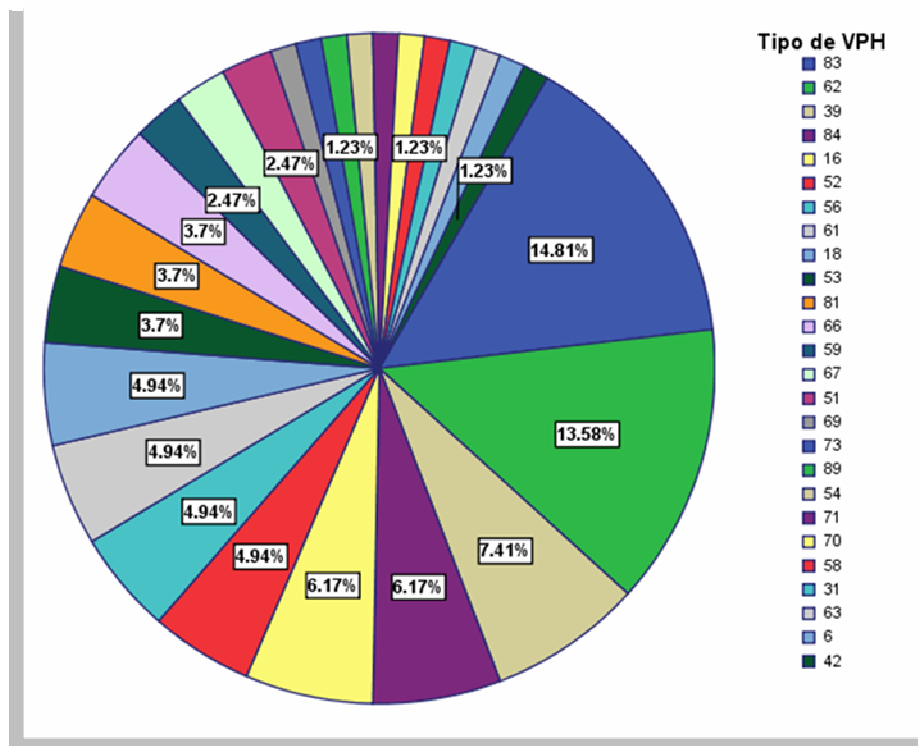


Figura 4.3. Prevalencia del VPH. Detectadas en las muestras de cepillado cervical de las pacientes en estudio.

4.1.3 Persistencia viral.

Del total de pacientes positivas, 23 presentaban infección con el mismo tipo viral que en la primera visita (del 2002), lo que representa un porcentaje de persistencia viral de 12.2%. El 30.5% de los virus de alto riesgo oncogénico persistieron, contra 57.8% de los de bajo riesgo y solo el 17.6% de los de riesgo desconocido (*Figura 4.4*).

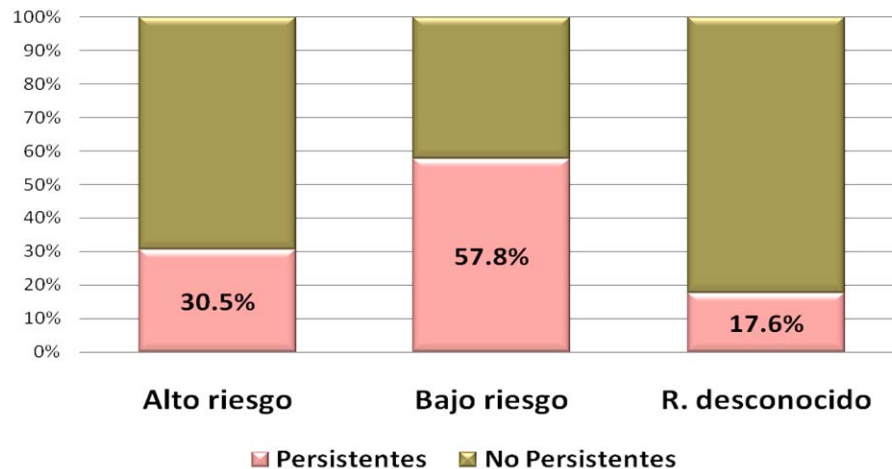


Figura 4.4. Persistencia viral por grupos de riesgo oncológico. Se analizaron por grupos de riesgo oncológico los porcentajes de virus persistentes encontrándose que el grupo que presentó mayor persistencia fue el de bajo riesgo oncológico. Los datos se analizaron por Chi cuadrada obteniendo un valor de $p = 0.049$ al comparar los de alto y bajo riesgo.

4.1.4 Resultados clínicos.

Al total de pacientes se les realizó una exploración ginecológica con toma de muestras para citología, así como un estudio colposcópico con toma de biopsia en los casos con indicación para la misma (Índice de concordancia $k = 0.77$ para el caso de lesiones).

Del total de citologías el 58.8% fueron negativas para cáncer, 3.4% presentaron atipia celular de significado incierto, 33.8% resultaron con lesión intraepitelial de bajo grado (LIEBG) y 4.1% con lesión intraepitelial de alto grado (LIEAG). Por el contrario, no se encontraron carcinomas. Al realizar el estudio colposcópico solo se indicó biopsia en el 42% de los casos en donde se reportó que el 15.8% fueron negativas para cáncer, el 68.4% con NIC I, un 7% con NIC II y 8.8% con NIC III, sin encontrar resultados positivos para

carcinoma. Lo anterior lo podemos observar en la *figura 4.5* en donde: la columna que corresponde a: “no se realizó” (columna azul claro) en el grupo de citologías se debió en su totalidad a que la paciente acudió durante su menstruación. En el caso de las biopsias se debió a que en la colposcopia no se detectaron lesiones que justificaran la toma de biopsia de tejido.

Las pacientes que resultaron con lesiones confirmadas por estudio histopatológico, fueron referidas de inmediato para su tratamiento.

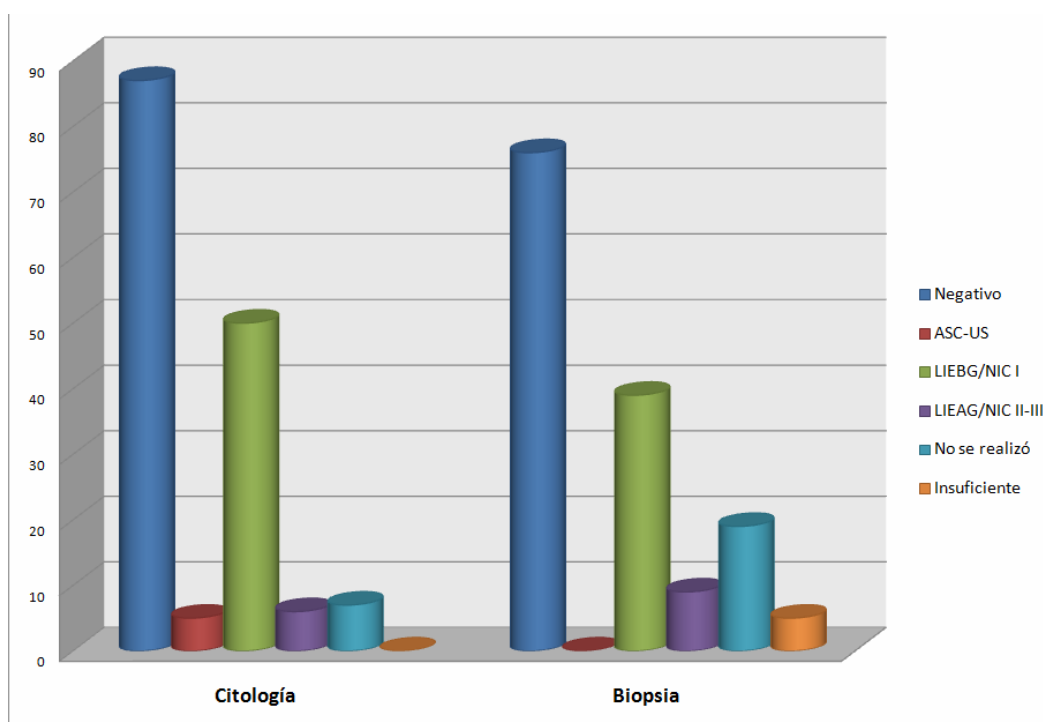


Figura 4.5. Resultados cito e histopatológicos. Se muestra la distribución de los resultados tanto para el estudio citológico por Papanicolaou como del estudio histopatológico de las biopsias obtenidas por colposcopia.

Desglosando los datos y comparando directamente los resultados citológicos e histopatológicos encontramos que:

♣ A un total de 6 pacientes no se les realizó estudio citológico debido a que acudieron durante su menstruación, sin embargo el estudio colposcópico sí se realizó y en el 100% se indicó biopsia de las cuales cuatro resultaron con diagnóstico de NIC I (que corresponde a LIEBG en la citología), una con NIC II (que corresponde a LIEAG en la citología) y una con resultado negativo.

♣ Más de la mitad de las citologías fueron negativas (58.8%) y al realizar el estudio colposcópico casi el 80% no requirieron la toma de biopsia. Sin embargo, para el resto de las pacientes estudiadas colposcópicamente si estuvo indicado el tomar biopsia y se reportaron cuatro NIC I.

♣ De las citologías reportadas con LIEBG (33.8%), más del 60% coincidieron con el reporte histopatológico y el resto no requirieron toma de biopsia al realizar la colposcopia. De las LIEAG (4.1%), el 100% coincidió con estudio histopatológico. Las lesiones reportadas como ASC-US (3.4%) también fueron detectadas por colposcopia y en el estudio confirmatorio se encontró una NIC I (33%) y dos NIC III (67%) (*Figura 4.6*).

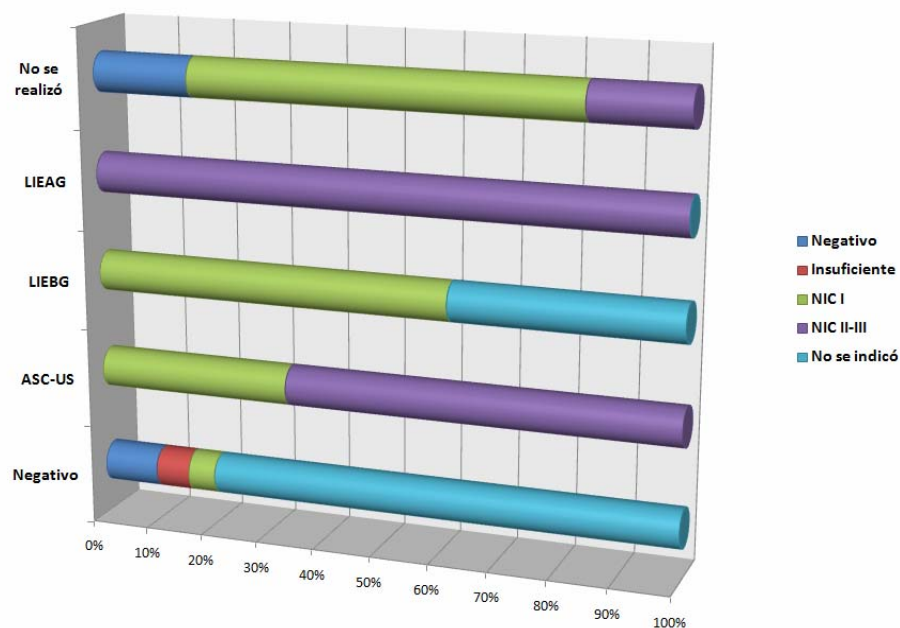


Figura 4.6. Comparación entre citologías y biopsias. Se realizó el estudio citológico y posteriormente colposcópico, en donde se examinaba el cuello uterino en busca de lesiones posterior a la aplicación de ácido acético. Se muestran las relaciones entre el resultado de las citologías y las biopsias en los casos en que se indicaron las mismas.

Al comparar los grupos de estudio (persistente vs no persistente) no se observó una diferencia significativa en cuanto a los resultados de las citologías y de las biopsias (*Figura 4.7. Panel “a” y “b” respectivamente*).

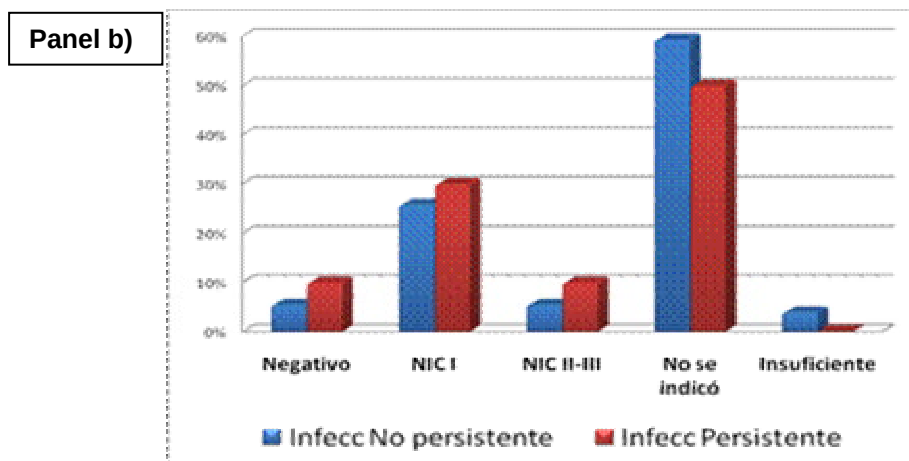
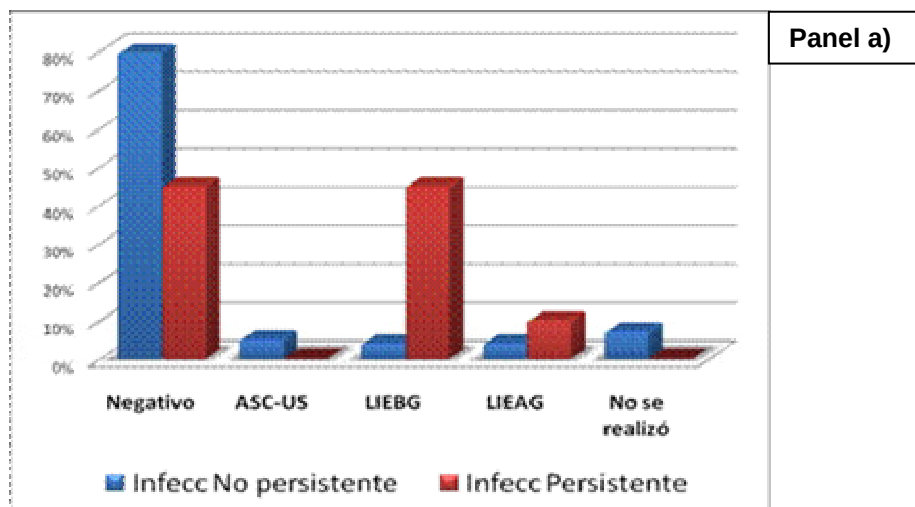


Figura 4.7. Resultados de citologías y biopsias por grupos. En el panel a) se muestran los resultados encontrados para las citologías. Del lado izquierdo se muestran los resultados del grupo de mujeres que eliminaron la infección y en el lado derecho los resultados correspondientes al grupo de mujeres con infección persistente. No se encontraron diferencias significativas al comparar entre grupos.

4.1.5 Resultados epidemiológicos.

Se analizaron antecedentes como tabaquismo, cáncer familiar, empleo de suplementos vitamínicos, empleo de suplementos vitamínicos que incluyeran B12/B9, inicio de vida sexual activa (IVSA), uso de anticonceptivos hormonales por más de 5 años (ACH), número de parejas sexuales y edad al primer embarazo. De las variables analizadas solo se

encontró significancia en el análisis para IVSA antes de los 16 años ($p = 0.002$) (*Cuadro 2*).

Cuadro 2. Características epidemiológicas.

Característica	Infec. No Persistente	Infec. Persistente	Valor de "p"
<i>Tabaquismo</i>	15.7%	8.6%	0.295
<i>Ca Familiar</i>	26.0%	26.0%	0.998
<i>Vitaminas</i>	16.3%	26.0%	0.252
<i>Vit. B12/B9</i>	10.9%	21.7%	0.128
<i>IVSA antes de los 16^a.</i>	19.8%	52.6%	0.002
<i>Edad 1er emb. Antes de los 16 a.</i>	14.3%	21.0%	0.696
<i># de parejas, más de dos.</i>	18.6%	15.7%	0.527
<i>ACH</i>	5.6%	5.3%	0.797

$p < 0.05$ = significativa. χ^2 y Prueba exacta de Fisher.

4.1.6 Resultados genéticos.

Estos fueron el objetivo central de la presente tesis. Se realizó la tipificación para los alelos del gen DQB1 del MHC. Las frecuencias alélicas y génicas se muestran en el *cuadro 3*, tanto de la población total como por grupos en cuanto a persistencia viral y no persistencia viral. Todos los alelos se mostraron en equilibrio de Hardy-Weinberg. En el *cuadro 4* se muestra el resultado del estudio de los riesgos con los valores de la razón de momios (OR) y los intervalos de confianza.

Los alelos más frecuentes en la población fueron DQB1*0302, DQB1*0301/13 y el DQB1*0402.

Cuadro 3. Frecuencias generales, alélicas y génicas para el gen DQB1.

ALELO	FGP ¹	FGNP ²	FAGP ³	FAGNP ⁴	FGGP ⁵	FGGNP ⁶	FAT ⁷	FGT ⁸
201/4	1	20	0.003	0.541	0.054	10.811	0.057	11.351
202	3	17	0.008	1.622	0.046	9.189	0.054	10.811
301/13	13	69	0.035	7.027	0.186	37.297	0.222	44.324
302	9	83	0.024	4.865	0.224	44.865	0.249	49.730
303/5	1	7	0.003	0.541	0.019	3.784	0.022	4.324
304/14	0	2	0.000	0.000	0.005	1.081	0.005	1.081
305	0	1	0.000	0.000	0.003	0.541	0.003	0.541
312	1	0	0.003	0.541	0.000	0.000	0.003	0.541
316	1	0	0.003	0.541	0.000	0.000	0.003	0.541
402	6	51	0.016	3.243	0.138	27.568	0.154	30.811
501	6	22	0.016	3.243	0.059	11.892	0.076	15.135
502	0	5	0.000	0.000	0.014	2.703	0.014	2.703
503	1	9	0.003	0.541	0.024	4.865	0.027	5.405
601	0	5	0.000	0.000	0.014	2.703	0.014	2.703
602	1	16	0.003	0.541	0.043	8.649	0.046	9.189
603	1	7	0.003	0.541	0.019	3.784	0.022	4.324
604	0	8	0.000	0.000	0.022	4.324	0.022	4.324
609/18	1	2	0.003	0.541	0.005	1.081	0.008	1.622
615/24	1	0	0.003	0.541	0.000	0.000	0.003	0.541

¹ Frecuencia en el grupo persistente; ² Frecuencia en el grupo no persistente; ³ Frecuencia alélica en el grupo persistente; ⁴ Frecuencia génica en el grupo persistente; ⁵ Frecuencia alélica en el grupo no persistente; ⁶ Frecuencia génica en el grupo no persistente; ⁷ Frecuencia alélica total; ⁸ Frecuencia génica total.

No se encontraron asociaciones significativas entre los alelos tipificados y la persistencia viral. Sin embargo si es posible observar cierta tendencia de algunos alelos como factores de riesgo de persistencia viral, como son los alelos DQB1*0609/18, DQB1*0501, DQB1*0301/13 y el alelo DQB1*0202.

Cuadro 4. Valores de riesgo (OR) para susceptibilidad o resistencia de los alelos del gen DQB1 del HLA clase II.

Alelo DQB1	FAGP ¹	FAGNP ²	OR ³	IC ⁴	P ⁵
201/4	0.003	0.541	0.3377	0.0442 - 2.5786	0.4930
202	0.008	1.622	1.2599	0.3544 - 4.4782	0.7254
301/13	0.035	7.027	1.4558	0.7267 - 2.9163	0.3420
302	0.024	4.865	0.7062	0.3270 - 1.5253	0.4670
303/5	0.003	0.541	1.0063	0.1209 - 8.3708	1.0000
312	0.003	0.541	-	-	0.1243
316	0.003	0.541	-	-	0.1243
402	0.016	3.243	0.8029	0.3236 - 1.9921	0.8274
501	0.016	3.243	2.0590	0.7875 - 5.3833	0.1386
503	0.003	0.541	0.7777	0.0962 - 6.2848	1.0000
602	0.003	0.541	0.4277	0.0553 - 3.3042	0.7066
603	0.003	0.541	1.0063	0.1209 - 8.3708	1.0000
609/18	0.003	0.541	3.5777	0.3179 - 40.260	0.3293
615/24	0.003	0.541	-	-	0.1243

¹ Frecuencia alélica en el grupo persistente; ² Frecuencia alélica en el grupo no persistente;

³ Razón de momios; ⁴ Intervalos de confianza; ⁵ Significancia estadística si < 0.005.

El resto de alelos encontrados no parecen tener asociación con la persistencia viral, de acuerdo a los análisis estadísticos empleados (Tablas de Chi²).

4.2 Discusión

Encontramos que la prevalencia de la infección por VPH aumenta en un grupo de pacientes seleccionado que previamente estuvo expuesto al virus, cosa que no se había reportado previamente en la literatura. Lo que nos puede decir que una vez que la paciente está expuesta a la infección por VPH a pesar de que elimine la infección tiene mayor probabilidad de presentar infección nuevamente por otro VPH. Esto se puede deber al comportamiento sexual de la paciente, por lo que sería importante dar un seguimiento a los factores de riesgo implicados en la transmisión de enfermedades sexuales para ver si este hecho puede verse modificado al cambiar la conducta de las pacientes.

La persistencia viral fue del 12.2%, lo cual se encuentra dentro de lo reportado en la literatura (14). Sin embargo, pudimos encontrar que los virus con mayor tendencia a persistir son los de bajo riesgo oncogénico. En otros reportes se habla de mayor persistencia en los virus de alto riesgo oncogénico debido a que se les encuentra con mayor frecuencia en etapas avanzadas de la enfermedad (11, 12 y 13). Sin embargo, ese dato no debería ser interpretado de esa manera, ya que los de mayor persistencia son los de bajo riesgo y esto puede explicar en parte, por qué en este estudio no encontramos mujeres con CaCU. Si todos los virus de alto riesgo tendieran a persistir, los porcentajes de CaCU serían mucho más elevados. Existen países, como el nuestro, en donde las tasas de incidencia de esta enfermedad continúan siendo muy elevadas (9), por lo que el componente

inmunológico en la resolución de la infección por el virus cobra mucha importancia.

Lo que también es importante destacar es cómo los virus de alto riesgo que se encuentran con mayor frecuencia en tumores, como son el VPH-16 y -18 han ido subiendo en lugar de prevalencia en comparación con los hallazgos de la primera visita (2002), en la que por lo menos el VPH-18 ocupaba el décimo lugar de prevalencia y ahora se encuentra en el sexto lugar. El virus de mayor prevalencia fue el tipo 83, que es considerado dentro del grupo de bajo riesgo oncogénico. Esto no se había reportado previamente, aunque debemos tomar en cuenta que los reportes existentes no hablan de una prevalencia en general como nosotros, siempre van enfocados a la prevalencia de los virus de alto riesgo como el tipo 16 y 18 (38).

Encontramos VPH en el 24.3% de las muestras negativas para cáncer en el Papanicolaou, 36% de las LIEBG fueron positivas para VPH en donde el virus más prevalente fue el tipo 83 (12%), seguido del tipo 18 (8%), el cuál fue el de mayor persistencia en este grupo. Para el caso de las LIEAG el 50% fue positivo para VPH, encontrando al VPH tipo 16 en una de las muestras el cuál fue persistente. No encontramos positividad para el VPH en el caso del ASC-H y de los 4 ASC-US reportados, esto probablemente debido al bajo número de muestras.

En cuanto a los factores de riesgo epidemiológicos, sólo encontramos asociación con persistencia en el caso de aquellas pacientes con inicio de la actividad sexual antes de los 16 años ($p = 0.002$). Sin embargo, en la literatura se han mencionado que existen otros factores ya demostrados para la persistencia (7, 16, 17, 87 y 88). En este trabajo la limitante, para esta parte, fue el número de pacientes estudiadas, ya que la “n” fue calculada para la parte genética del mismo. Probablemente si la muestra fuera mayor podríamos establecer las asociaciones con el resto de características epidemiológicas.

Por otro lado, hemos hablado durante el desarrollo del marco teórico, sobre la importancia de la respuesta inmune de cada paciente en la resolución de la infección por el VPH y el riesgo de desarrollar lesiones e incluso CaCU (7, 58). Es a múltiples niveles en donde la respuesta inmune es susceptible a errores y depende de un buen funcionamiento a todos estos niveles para que se pueda eliminar la infección en el lapso de 12 a 24 meses.

Uno de los pasos importantes en el reconocimiento y eliminación del virus es la presentación antigénica a través del MHC clase II, la cual interviene directamente en la comunicación de la respuesta inmune innata y adaptativa y de esto depende la adecuada activación de los linfocitos T y finalmente, la formación de células de memoria. Diversos estudios han hablado sobre alelos de este complejo que se asocian a susceptibilidad para CaCU así como alelos asociados a resistencia de la enfermedad (90, 71, 72, 74, 70). Todos estos estudios no han logrado converger en una misma respuesta en

cuanto a si un alelo es protector o es de riesgo (71). Esto se debe seguramente a la variabilidad en cuanto al MHC entre las diferentes poblaciones, así como a las diferencias en el diseño de los estudios y en el número de muestra incluido en cada estudio. En nuestra población encontramos algunos alelos que ya han sido descritos en otras poblaciones, como lo son el DQB1*0609/18, DQB1*0501, DQB1*0301/13 y el alelo DQB1*0202. Además, los alelos DQB1*0201/4 y DQB1*0602 mostraron menor riesgo para persistencia de la infección viral lo cual también concuerda con reportes en la literatura para otras poblaciones (71 – 74). A pesar de no poder comprobar que estos resultados no se deben al azar, debemos insistir en que lo encontrado está reportado ya para otras poblaciones, por lo que habría que aumentar el grupo de pacientes persistentes para la infección con el objetivo de mejorar las condiciones para el análisis. Además, este es el primer estudio reportado que se realiza en nuestra población por lo que no contamos, hasta ahora, con datos en la literatura para comparar nuestros resultados. Así mismo, serán de mayor utilidad estos resultados cuando se completen con los datos de la tipificación de alelos para DRB1, lo cuál formará parte de un proyecto a futuro.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Podemos concluir que:

- Definitivamente existen alelos del MHC que están implicados con susceptibilidad para la persistencia de la infección por VPH, sin embargo esto no es suficiente para el desarrollo de lesiones.
- Deben sumarse factores clínicos y epidemiológicos del huésped a los factores genéticos del mismo y esto aunado a los factores propios del virus es lo que determinará el desarrollo o no de lesiones y CaCU.
- Los métodos de tamizaje actuales definitivamente son limitados, a pesar de su gran utilidad deberían de estar complementados con otros métodos.
- Como pudimos observar con los resultados deberían sumarse los resultados citológicos y de colposcopia a los factores de riesgo epidemiológicos de la paciente y además, realizar tamizajes moleculares en busca de factores de riesgo genéticos para que de esta forma, los esfuerzos y los recursos económicos puedan dirigirse a grupos de

mujeres con un alto riesgo de desarrollar lesiones de alto grado y CaCU y poder utilizar las herramientas moleculares para el estudio del VPH a estas mujeres en alto riesgo.

- Las mujeres con bajo riesgo desde el punto de vista clínico, epidemiológico y genético podrían recibir un seguimiento más espaciado y el gasto de recursos se podría dirigir a los grupos de alto riesgo con seguimientos más frecuentes y estudios moleculares del VPH que en la actualidad son muy costosos.
- Creemos que en nuestro país es necesario aplicar este tipo de lineamientos, ya que no contamos con recursos suficientes para llevar a cabo los tamizajes que se realizan en países desarrollados como los de Europa y USA, en donde a todas las mujeres les realizan detección molecular del VPH y el seguimiento del Pap.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Herrera Gómez A, Granados García M y González Barón M. "Manual de Oncología" Procedimientos médico quirúrgicos. McGraw Hill, 3ª ed. México. 2006.
2. Franco EL, Duarte-F E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. CMAJ. 2001;164(7):1017-25.
3. Monsonego J. HPV infections and cervical cancer prevention. Priorities and new directions. Highlights of EUROGIN 2004 International expert meeting. Gynecologic Oncology. 2005;96:830-9.
4. Cugliano V, Buan R, Strulf K, Grusse Y. Carcinogenicity of human papillomaviruses. WHO IARC. 2005;6:204.
5. Odunsi KO, Ganesan TS. The roles of the human major histocompatibility complex and human papillomavirus infection in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. Clin Oncol (R Coll Radiol) 1997; 9(1):4-13.
6. Rios Dalenz J, Castro MD. Evaluación de la Situación del Cáncer de Cuello Uterino en Bolivia. Revisión.

7. Valdespino Gomez VM, Valdespino Castillo VE. Current perspectives in cervical cancer. Ginecol Obstet Mex. 2004 Jan;72(1):29-38.
8. Palacio-Mejia LS, Rangel-Gomez G, Hernandez-Avila M, Lazcano-Ponce E. Cervical cancer, a disease of poverty: mortality differences between urban and rural areas in Mexico. Salud Publica Mex. 2003;45 Suppl 3:S315-25.
9. INEGI. Información sobre Tumores Malignos. México, D.F., Febrero de 2005.
10. Chen Y, Hunter DJ. Molecular epidemiology of cancer. CA Cancer J Clin. 2005;55:45-54.
11. Muñoz N, Bosch X, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders P, Meijer C. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med. 2003;348:518-27.
12. Bosch FX, Muñoz N. The viral etiology of cervical cancer. Virus Research. 2002;89:183-90.
13. Villa LL. Human papillomaviruses and cervical cancer. Adv. Cancer Res. 1997;71:321-41.
14. Franco EL, Duarte-F E, Ferenczy A. Cervical cáncer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. CMAJ. 2001;164(7):1017-25.

15. Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EK, van der Linden HC, Voorhorst FJ, Kenemans P, Meijer CJ. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet*. 1999;354(9172):20-5.
16. Hellberg D, Nilsson S, Haley NJ, Hoffmen D, Wynder E. Smoking and cervical intraepithelial neoplasia: nicotine and cotinine in serum and cervical mucus in smokers and nonsmokers. *Am J Obstet Gynecol*. 1988;158:910-3.
17. Sierra-Torres CH, Au WW, Arrastia CD, Cajas-Salazar N, Robazetti SC, Payne DA, Tying SK. Polymorphisms for chemical metabolizing genes and risk for cervical neoplasia. *Environ Mol Mutagen*. 2003;41:69-76.
18. Chen Y, Hunter DJ. Molecular epidemiology of cancer. *CA Cancer J Clin*. 2005;55:45-54.
19. Dunne EF, Markowitz LE. Genital human papillomavirus infection. *Clin Infect Dis*. 2006;43(5):624-9.
20. Wright TC, Cox JT, Massad LS, Carlson J, Twigg LB, Wilkinson EJ; American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;189(1):295-304.

21. Henry MR. The Bethesda System 2001: an update of new terminology for gynecologic cytology. Clin Lab Med. 2003;23(3):585-603.
22. Nucci MR, Crum CP. Redefining early cervical neoplasia: recent progress. Adv Anat Pathol. 2007;14(1):1-10.
23. Sherman ME, Schiffman MH, Erozan YS, Wacholder S, Kurman RJ. The Bethesda System. A proposal for reporting abnormal cervical smears based on the reproducibility of cytopathologic diagnoses. Arch Pathol Lab Med. 1992;116(11):1155-8.
24. Cann A. Virology: Papillomaviruses. Microbiology@Leicester. Encontrado en: <http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/Papillomaviruses.html>
25. Zur Hausen H. Papillomavirus infection: a major cause of human cancers. Biochem Biophys Acta. 1996;1288:F55-78.
26. Los Alamos National Laboratory Bioscience Division. PV types and hosts. Encontrado en: <http://hpv-web.lanl.gov/>
27. Wagner EK, Hewlett MJ. Basic Virology. 1999. USA. Editorial Blackwell Science.

28. Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):886-91.
29. Muñoz N, Bosch X, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders P, Meijer C. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348:518-27.
30. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Research.* 2002;89:191-9.
31. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature.* 2002;2:342-50.
32. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005;32(1):S7-15.
33. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324(1):17-27.
34. International papillomavirus workshop 1995 Quebec.
35. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324(1):17-27.

36. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.* 2005;32(1):S1-6.
37. Stöppler MC, Ching K, Stöppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol.* 1996;70(10):6987-93.
38. Giannoudis A, Herrington CS. Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J Pathol.* 2001;193(3):295-302.
39. Sichero L, Ferreira S, Trottier H, Duarte-Franco E, Ferenczy A, Franco EL, Villa LL. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int J Cancer.* 2007;120(8):1763-8.
40. Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol.* 2000;81(Pt 12):2959-68.
41. Veress G, Szarka K, Dong XP, Gergely L, Pfister H. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol.* 1999;80(Pt 4):1035-43.

42. Burk RD, Teraï M, Gravitt PE, Brinton LA, Kurman RJ, Barnes WA, Greenberg MD, Hadjimichael OC, Fu L, McGowan L, Mortel R, Schwartz PE, Hildesheim A. Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res.* 2003;63(21):7215-20.
43. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol.* 1997;71(3):2463-72.
44. Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galván SC, Estrada RA, Yunes E, García-Carrancá A, González-Lira G, Madrigal-de la Camapa A. Asian-American Variants of Human Papillomavirus 16 and Risk for Cervical Cancer: a Case-Control Study. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:1325-30.
45. Xi LF, Kiviat NB, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, Ho J, Koutsky LA. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(15):1045-52.
46. Xi LF, Kiviat NB, Wheeler CM, Kreimer A, Ho J, Koutsky LA. Risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 after loop electrosurgical excision procedure associated with human papillomavirus type 16 variants. *J Infect Dis.* 2007;195(9):1340-4.

47. Gharizadeh B, Zheng B, Akhras M, Ghaderi M, Jejelowo O, Strander B, Nyrén P, Wallin KL, Pourmand N. Sentinel-based DNA genotyping using multiple sequencing primers for high-risk human papillomaviruses. *Mol Cell Probes*. 2006;20(3-4):230-8.
48. Iftner T, Villa LL. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;31:80-8.
49. Wright TC, Denny L, Kuhn L, Pollack A, Lorincz A. HPV DNA testing of self-collected vaginal samples compared with cytologic screening to detect cervical cancer. *JAMMA*. 2000;283(1):81-6.
50. Poljak M, Fujs K, Seme K, Kocjan BJ, Vrtacnik-Bokal E. Retrospective and prospective evaluation of the Amplicor HPV test for detection of 13 high-risk human papillomavirus genotypes on 862 clinical samples. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*. 2005;14(4):147-52.
51. Lörincz AT. Screening for cervical cancer: new alternatives and research. *Salud Publica Mex*. 2003;45(3):S376-87.
52. Lin H, Moh JS, Ou YC, Shen SY, Tsai YM, ChangChien CC, Liu JM, Ma YY. A simple method for the detection and genotyping of high-risk human papillomavirus using seminested polymerase chain reaction and reverse hybridization. *Gynecol Oncol*. 2005;96(1):84-91.

53. Tieben LM, ter Schegget J, Minnaar RP, Bouwes Bavinck JN, Berkhout RJ, Vermeer RJ, Jebbink MF, Smits HL. Detection of cutaneous and genital HPV types in clinical samples by PCR using consensus primers. *J Virol Methods*. 1993;42(2-3):265-79.
54. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):357-61.
55. Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T, Scott DR, Rush BB, Lawler P, Sherman ME, et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis*. 1994;169(2):235-40.
56. Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol*. 1998;36(10):3020-7.
57. Castle PE, Schiffman M, Gravitt PE, Kendall H, Fishman S, Dong H, Hildesheim A, Herrero R, Bratti MC, Sherman ME, Lorincz A, Schussler JE, Burk RD. Comparisons of HPV DNA detection by MY09/11 PCR methods. *J Med Virol*. 2002;68(3):417-23.

58. Nussbaum RL, McInnes RR, Williard HF. Genética en Medicina. Thompson and Thompson. 1ª ed. 2004. España. Editorial Masson.
59. Janeway CA, Travers P, Walport M, Sholomchik W. Immunobiology. The immune system in health and disease. 4ª ed en español. Capítulo 4. 2000. USA. Editorial Churchill Livingstone.
60. Janeway CA, Travers P, Walport M, Sholomchik W. Immunobiology. The immune system in health and disease. 5ª ed. 2001. USA. Editorial Churchill Livingstone.
61. Steinman RM. Dendritic Cells and the Control of Immunity: Enhancing the Efficiency of Antigen Presentation. Mt Sinai J Med. 2001;68(3):160-6.
62. Goncalves MA, Donadi EA. Immune cellular response to HPV: current concepts. Braz J Infect Dis. 2004;8(1):1-9.
63. Asahina A, Tamaki K. Role of Langerhans cells in cutaneous protective immunity: is the reappraisal necessary?. J Dermatol Sci. 2006;44(1):1-9.
64. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. N Engl J Med. 2000;343(10):702-9.

65. Klein J. George Snell's first foray into the unexplored territory of the major histocompatibility complex. *Genetics*. 2001;159(2):435-9.
66. Klein J, Sato A. Birth of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*. 1998;47(3):199-209.
67. Marsh SGE. IMGT/HLA Sequence Database. Encontrado en: <http://www.anthonynolan.com/HIG/>
68. Chamuleau ME, Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA. MHC class II molecules in tumour immunology: prognostic marker and target for immune modulation. *Immunobiology*. 2006;211(6-8):619-25.
69. Maffei A, Harris PE. Peptides bound to major histocompatibility complex molecules. *Peptides*. 1998;19(1):179-98.
70. Momburg F, Herrmann B, Moldenhauer G, Möller P. B-cell lymphomas of high-grade malignancy frequently lack HLA-DR, -DP and -DQ antigens and associated invariant chain. *Int J Cancer*. 1987;40(5):598-603.
71. Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res*. 2002;89(2):229-40.

72. Apple RJ, Erlich HA, Klitz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. *Nat Genet.* 1994;6:157-62.
73. Hildesheim A, Schiffman M, Scott DR, Kissner T, Sherman ME, Glass AG, Manos MM, Lorincz AT, Kurman RJ, Buckland J, Rush BB, Carrington M. Human leukocyte antigen class I/II alleles and development of human papillomavirus-related cervical neoplasia: results from a case-control study conducted in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998;7(11):1035-41.
74. Ferrera A, Olivo A, Alaez C, Melchers WJ, Gorodezky C. HLA DQA1 and DQB1 loci in Honduran women with cervical dysplasia and invasive cervical carcinoma and their relationship to human papillomavirus infection. *Hum Biol.* 1999;71(3):367-79.
75. Silva B, Vargas-Alarcón G, Zúñiga-Ramos J, Rodríguez-Reyna TS, Hernández-Martínez B, Osnaya N, Kofman S, Torres-Lobatón A, Granados J. Genetics features of Mexican women predisposing to cancer of the uterine cervix. *Hum Pathol.* 1999;30(6):626-8.
76. Gerlach JA. Human lymphocyte antigen molecular typing: how to identify the 1250+ alleles out there. *Arch Pathol Lab Med.* 2002;126(3):281-4.

77. Bugawan TL, Erlich HA. Rapid typing of HLA-DQB1 DNA polymorphism using nonradioactive oligonucleotide probes and amplified DNA. *Immunogenetics*. 1991;33(3):163-70.
78. Aldener-Cannavá A, Olerup O. HLA-DQB1 “low-resolution” typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP). *Eur J Immunogenet*. 1994;21(6):447-55.
79. Adams SD, Krausa P, McGinnis M, Simonis TB, Stein J, Marincola FM. Practicality of high throughput HLA sequence-based typing. *Scientific Communications. ASHI Quarterly*. 2001;25(2):54-7.
80. Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci Total Environ*. 2000;247(2-3):295-311.
81. Baak JP, Kruse AJ, Janssen E, van Diermen B. Predictive testing of early CIN behaviour by molecular biomarkers. *Cell Oncol*. 2005;27(5-6):277-80.
82. Hartwell L. History of the International Cancer Biomarker Consortium. Fred Hutchinson Cancer Research Center. Encontrado en: http://fhcrc.org/science/international_biomarker/history.html

83. Wong YF, Cheung TH, Tsao GS, Lo KW, Yim SF, Wang VW, Heung MM, Chan SC, Chan LK, Ho TW, Wong KW, Li C, Guo Y, Chung TK, Smith DI. Genome-wide gene expression profiling of cervical cancer in Hong Kong women by oligonucleotide microarray. *Int J Cancer*. 2006;118(10):2461-9.
84. Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception?. *Histopathology*. 2002;40(1):2-11.
85. Chen YC, Hunter DJ. Molecular epidemiology of cancer. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(1):45-54.
86. Padilla-Paz LA. Emerging technology in cervical cancer screening: status of molecular markers. *Clin Obstet Gynecol*. 2005;48(1):218-25.
87. Smith JS, Bosetti C, Muñoz N, Herrero R, Bosch FX, Eluf-Neto J, Meijer CJ, Van den Brule JC, Franceschi S, Peeling RW. Chlamydia Trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Int J Cancer*. 2004;111:431-9.
88. Jha PK, Beral V, Peto J, Hack S, Hermon C, Deacon J, Mant D, Chilvers C, Vessey MP, Pike MC, Müller M, Gissman L. Antibodies to human papillomavirus and to other genital infectious agents and invasive cervical cancer risk. *Lancet*. 1993;341:1116-8.

89. How HPV Contributes To The Risk Of Developing Cancer. (En línea 2006).
Disponibile en <http://www.cervical-cancer-causes.com/html/human-papillomavirus-hpv.php3>
90. Helland A, Borresen AL, Kristensen G, Ronningen KS. DQA1 and DQB1 genes in patients with squamous cell carcinoma of the cervix: relationship to human papillomavirus infection and prognosis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 1994;3:479-86.
91. Lazcano-Ponce EC, Moss S, Alonso de Ruíz P, Salmerón Castro J, Hernández Avila M. Cervical cáncer screening in developing countries: why is it ineffective? The case of Mexico. *Arch Med Res*. 1999;30(3):240-50.
92. Lazcano-Ponce EC, Castro R, Allen B, Nájera P, Alonso de Ruíz PA, Hernández-Avila M. Barriers to early detection of cervical-uterine cáncer in Mexico. *J Womens Health*. 1999;8(3):399-408.
93. Hunt R. Virology-Chapter Seven Part Seven. (En línea 2006). Disponible en: <http://pathmicro.med.sc.edu/lecture/hiv7.htm>.
94. Bowers W. Immunology-Chapter Ten. (En línea 2006). Disponible en: <http://pathmicro.med.sc.edu/bowers/mhc.htm>.

ANEXO I

Tabla 1. Clasificación del CaCU según la FIGO.

Estadio 0	Carcinoma <i>in situ</i> o carcinoma intraepitelial
Estadio I	El carcinoma está estrictamente limitado al cérvix
Ia	Carcinoma invasivo identificado sólo en forma microscópica. Todas las lesiones observables, aún con invasión superficial son lesiones Ib. La invasión está limitada a una invasión estrómicica medida con un máximo de 5mm y no mayor de 7mm en amplitud.
Ia1	La invasión medida no es mayor de 3mm en profundidad y no más de 7mm en extensión superficial.
Ia2	La extensión medida de la invasión estrómicica es mayor de 3mm, pero no mayor de 5mm en profundidad y la extensión horizontal es menor de 7mm; las lesiones mayores deben considerarse estadio Ib
Ib	Lesión clínica confinada al cérvix o lesiones preclínicas mayores que el estadio Ia
Ib1	Lesiones clínicas no mayores de 4cm.
Ib2	Lesiones clínicas mayores de 4cm.
Estadio II	El carcinoma se extiende más allá del cuello uterino, pero no a la pared pélvica. El carcinoma compromete la vagina, pero no hasta el tercio inferior.
Ila	No hay afección obvia parametrial.
Ilb	Afección parametrial evidente
Estadio III	El carcinoma se extiende a la pared pélvica. En el examen rectal no hay espacio libre entre el tumor y la pared pélvica, o el tumor afecta el tercio inferior de la vagina o son casos con hidronefrosis o exclusión renal, a menos que se deba a otras causas conocidas.
IIla	No se extiende a la pared pélvica, pero alcanza el tercio inferior de la vagina.
IIlb	Extensión a la pared pélvica o hidronefrosis o insuficiencia del riñón, o todas ellas.
Estadio IV	El carcinoma se extiende más allá de la pelvis verdadera o clínicamente compromete la mucosa de la vejiga o recto. El edema bufoso no permite asignar un estadio IV.
Estadio IVa	Diseminación a los órganos adyacentes.
Estadio IVb	Diseminación a los órganos distantes.

Tomado de: Manual de Oncología del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN).¹

ANEXO II

Hoja de consentimiento informado

Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y la Secretaría de Salud de Nuevo León.

Consentimiento Informado Para Exploración Ginecológica y Toma de Sangre

Estimada Paciente,

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

En esta investigación, que se realizará en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, queremos conocer el comportamiento del virus cuando infecta el cuello de la matriz, además de estudiar algunos de los posibles factores que pudieran ayudar a la persistencia de esta infección, ya que esta se asocia con mayor riesgo de desarrollar cáncer cervicouterino. Para esta investigación se necesitarán muestras de sangre y muestras del examen ginecológico que se utiliza para la detección oportuna del cáncer (Papanicolaou). Si usted desea contribuir voluntariamente en esta investigación, le vamos a pedir que:

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

Estoy enterada que:

- ❖ Las muestras de sangre y papanicolaou servirán para que los científicos conozcan que factores ayudan a la persistencia de la infección del virus del papiloma humano y qué factores ayudan a eliminarla.
- ❖ Si no quiero dar una muestra para este estudio, la atención médica que recibiré no se verá afectada de ninguna manera y recibiré el trato considerado que merezco.
- ❖ Para garantizar mi privacidad, la muestra y el cuestionario para este estudio estarán marcados con un número en lugar de mi nombre. Este número será usado para identificar el reporte de mi muestra y solo será conocido por mi médico y por el laboratorio de citología, perteneciente a la SSNL y/o al Departamento de Patología del Hospital Universitario, según sea el caso, donde rutinariamente se analizan las muestras de Papanicolaou.

El proyecto de esta investigación ha sido aprobado por los Comités de Investigación y Ética del Hospital Universitario y Facultad de Medicina de la UANL y de la SSNL.

Firma o huella digital de la persona que da el consentimiento

Fecha

Nombre completo: _____

ANEXO III

CUESTIONARIO

Le agradecemos que haya decidido participar en esta importante investigación acerca de la persistencia de la infección del virus del papiloma humano que se esta realizando en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Hospital Universitario “Dr. José E. González” y el Servicio de Salud Reproductiva de la Secretaria de Salud de Nuevo León.

Por favor llene o circule la respuesta correcta.

1. ¿Es usted originaria de Nuevo León?

a) Sí

b) No ¿de dónde?: _____

2. ¿Cuántos años tiene usted?

3. ¿Cuánto tiempo ha vivido en el estado de Nuevo León? _____ años

4. ¿De dónde son originarios sus padres?

5. ¿De dónde son originarios sus abuelos?

6. ¿Cuál es su fecha de nacimiento? _____ / _____ / _____
Día Mes Año

7. Nivel de estudios:

- a) Ninguno
- b) Leer y escribir solamente
- c) Primaria
- d) Secundaria-Nivel técnico
- e) Preparatoria
- f) Licenciatura

8. Estado civil:

- a) Soltera
- b) Casada
- c) Viuda
- d) Divorciada
- e) Unión libre

9. ¿Con qué tipo de servicio médico cuenta usted?

- a) IMSS
- b) ISSSTE
- c) Centros de salud y hospitales de la Secretaría de Salud
- d) Seguro privado
- e) Ninguno

10. Edad de la primera menstruación (primera regla): _____años

11. ¿Cuál es la fecha de su última menstruación? _____/_____/_____
Día Mes Año

12. Edad de inicio de su vida sexual: _____años

13. ¿Esta actualmente embarazada?

- a) Sí b) No (Pase a la pregunta 16) c) No sé

14. ¿Cuántas veces ha estado embarazada anteriormente? _____
(Si no ha estado embarazada pase a la pregunta 16)

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

15. ¿Cuántos años tenía cuando tuvo su primer embarazo? _____años

16. Mencione el número de personas en su familia que han tenido embarazos antes de los 18 años.

17. ¿Sabe qué es el PAPANICOLAOU?

a) Sí,
Explíquelo por favor con sus palabras: _____

b) No sé

18. ¿Alguna vez le han hecho el **examen** de cáncer de matriz o Papanicolaou?

a) Si

b) No ¿Por qué? _____
(Pase a la pregunta 28)

19. ¿A qué edad se lo realizó por primera vez? _____ años, y ¿Por qué? _____

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

21. Fecha del último Papanicolaou? _____ / _____
Mes Año

22. Institución donde se lo practicó (PAP):

a) IMSS

b) ISSSTE

c) Centros de salud y hospitales de la Secretaria de Salud

d) Seguro privado

e) Otro (especifique) _____

23. ¿Cuál fue el resultado de su examen de Papanicolaou más reciente?

a) Normal

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

c) No supe el resultado _____

24. ¿Recibió tratamiento, cuál y por qué?

a) Sí

b) No

25. Si usted tuvo cáncer de matriz. Marque el tratamiento que recibió (Marque una o varias opciones)

a) Cauterización

b) Cirugía

c) Radioterapia

d) Quimioterapia

e) Otra (especifique por favor) _____

f) No sé

26. ¿Dónde recibió tratamiento para este cáncer?

Nombre de la Institución: _____

Dirección de la Institución: _____

27. ¿Edad que tenía usted cuando le diagnosticaron el cáncer? _____ años

28. ¿Toma usted algún suplemento vitamínico?

a) Sí

b) No

29. ¿Sabe si en este suplemento esta incluida la vitamina B9, B12 o ácido fólico?

a) Sí, ácido fólico

b) Sí, vitamina B

c) No

d) No sé

30. ¿Fuma o ha fumado?

a) Sí

b) No

31. ¿Desde hace cuánto tiempo?

32. ¿Cuántos cigarros?

a) 1 - 10 cigarros por día

b) 11 – 20 cigarros por día

c) Más de 20 cigarros por día

d) No fumo

33. Número de compañeros sexuales que ha tenido: _____

34. ¿Su(s) compañero(s) sexual(es) tiene circuncisión?

(Si no sabe lo que es circuncisión por favor pregunte al médico que realiza la encuesta para que pueda responder a esta pregunta)

a) Sí

b) No

c) No sé

35. ¿Usa algún método anticonceptivo?

a) Sí

b) No (pase a la pregunta 37)

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

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

37. ¿Ha utilizado alguno de los siguientes anticonceptivos?

- a) Inyecciones para el control de natalidad ¿Por cuánto tiempo?_____
- b) Píldoras/anticonceptivos orales ¿Por cuánto tiempo? _____
- c) Implante subdérmico ¿Por cuánto tiempo? _____
- d) Anillo vaginal ¿Por cuánto tiempo? _____
- e) Parche anticonceptivo ¿Por cuánto tiempo? _____

38. ¿Ha padecido enfermedades de transmisión sexual?

- a) Sí
- b) No
- c) No sé

39. ¿Conoce el nombre de la enfermedad de transmisión sexual que le diagnosticaron?

- a) Sí,
menciónelo:_____
- b) No

40. Tiene usted:

- a) Diabetes (enfermedad del azúcar) Mencione la edad en que se la diagnosticaron: _____años.
- b) Presión alta (hipertensión) Mencione la edad en que se la diagnosticaron: _____años.
- c) Cáncer de mama. Mencione la edad en que se lo diagnosticaron: _____años. ¿Recibió tratamiento? Sí No

41. ¿Alguien en su familia tiene o ha tenido algún tipo de cáncer?

a) Sí

Mencione quién y qué tipo de cáncer (si lo recuerda)

b) No

42. ¿Ha tenido flujo vaginal o desecho vaginal en la última semana?

a) Sí

b) No

43. ¿Está bajo algún tratamiento actualmente para el flujo vaginal?

a) Sí

b) No

Menciónelo: _____

¡¡GRACIAS POR PARTICIPAR!!

**POR FAVOR, REVISE QUE NO HAYA QUEDADO ALGUNA PREGUNTA SIN
CONTESTAR**

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

SOFÍA BERNAL SILVA

Candidato para el Grado de
Maestro en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Tesis

“Estudio de la susceptibilidad al desarrollo de lesiones premalignas y cancerosas de
cérvix en mujeres infectadas con el virus del papiloma humano”

Campo de estudio: Biología Molecular

Biografía

Lugar de Nacimiento: San Luis Potosí, S.L.P.

Fecha: 17 de Junio de 1978.

Padres: Sofía Silva Romero y Eduardo Bernal Azanza.

Educación

Licenciatura: Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Grado obtenido: Médico Cirujano.