

**Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Medicina de Mexicali**



Hospital General de Tijuana
Instituto de Servicios de Salud de Baja California
Departamento de Enseñanza e Investigación



**PREVALENCIA DEL VPH DE ALTO RIESGO EN LESIONES DE BAJO
GRADO POR EL METODO DE CAPTURA DE HÍBRIDOS**

**TESIS PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIDAD EN
MEDICINA INTEGRADA**

PRESENTADO POR:

Dra. Marisela López Mezta

TUTORA:

Dra. Ana Elizabeth Medrano Ureña

ASESORAS:

Dra. Ana Elizabeth Medrano Ureña

Dra. María Gudelia Rangel Gómez

Tijuana, B.C. 2010

FIRMAS

ASESOR DE TESIS

Dra. Ana Elizabeth Medrano Ureña

Ginecóloga y Colposcopista

Adscrito al Servicio de Ginecología y Clínica de displasias

Dra. María Gudelia Rangel Gómez

Coordinadora de la Comisión de Salud Fronteriza México/Estados Unidos en Baja California y profesora e investigadora del Departamento de Estudios de Población en El Colegio de la Frontera Norte

JEFE DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION

Dra. Leticia Falcón Noriega

Pediatra

DIRECTOR DEL HOSPITAL GENERAL DE TIJUANA

Dr. José Manuel Robles Barbosa

Traumatólogo

TUTOR DE LA ESPECIALIDAD DE MEDICINA INTEGRADA

Dra. Ana Elizabeth Medrano Ureña

Ginecología y Colposcopista

Adscrito al Servicio de Ginecología y Clínica de displasias

AGRADECIMIENTOS

A Dios Por permitirme llegar hasta este momento tan importante en mi vida y lograr otra meta más en mi carrera, por estar conmigo en cada paso que doy, por iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mi Madre y Hermanos que me acompañaron en esta aventura que significo mi especialidad y que, de forma incondicional, entendieron mis ausencias, mis malos momentos, y me impulsaron a seguir adelante en mi profesión

A la Dra. Ana Elizabeth Medrano Ureña por haber confiado en mi persona, por la paciencia y por la dirección de este trabajo.

A todos mis amigos pasados y presentes; pasados por ayudarme a crecer y madurar como persona y presentes por estar siempre conmigo apoyándome en todo las circunstancias posibles, también son parte de esta alegría.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi ms sincero agradecimiento.

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad. A todas estas personas les dedico este trabajo.

INDICE

Contenido

Capítulo I

Introducción	5
--------------	---

Capítulo II

Epidemiología	8
---------------	---

Patogenia	12
-----------	----

Diagnostico	15
-------------	----

Capítulo III

Planteamiento del problema y Justificación de la investigación	20
--	----

Capítulo IV

Objetivo general, Objetivos específicos e Hipótesis	21
---	----

Capítulo V

Diseño, Material y Métodos	22
----------------------------	----

Capítulo VI

Resultados	25
------------	----

Capítulo VII

Discusión	29
-----------	----

Capítulo VIII

Conclusiones	31
--------------	----

CAPITULO IX

Bibliografía	32
--------------	----

CAPITULO I

Introducción:

El virus del papiloma, pertenece a la familia Papillomaviridae, una familia recientemente reconocida como distinta de los polyomavirus por el Consejo Internacional para la Taxonomía de los Virus, (ICTV). Infechan específicamente el epitelio escamoso de más de 20 especies diferentes de mamíferos. (1)

La partícula viral del papiloma humano tiene una cápside de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), con un diámetro aproximado de 55 nm y que contiene al genoma viral. Los capsómeros están hechos de dos proteínas estructurales: L1 en mayor proporción y L2. El VPH es relativamente estable y debido a que no tiene una envoltura, permanece infeccioso en un ambiente húmedo por meses. El resultado usual de la infección por VPH es una verruga o papiloma.

Los virus genitales, tanto oncogénicos como no oncogénicos, pueden causar lesión intraepitelial de bajo grado (LIBG) en la zona de transformación del cuello uterino. La LIBG, también conocida como NIC 1 (neoplasia intraepitelial cervical, grado 1) bajo otro sistema de clasificación, son manifestaciones transitorias de la infección viral productiva. Se caracteriza por presentar mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en el tercio inferior del epitelio. Este se diferencia y madura, mostrando anormalidades menores de la célula. La zona de transformación del cuello uterino es la unión entre el epitelio columnar del endocervix y el epitelio escamoso del ectocervix. Es un sitio de continuos cambios metaplásicos, más activos en la pubertad y durante el primer embarazo y declinan después de la menopausia. Una metaplasia escamosa atípica, inducida por algún virus y que se desarrolle en esta región, puede progresar a una lesión Intraepitelial de alto grado (LIAR), que también se conoce como NIC 2 o NIC 3, las verdaderas precursoras del CaCu y que se caracterizan por presentar mayor actividad mitótica y contenido de

células inmaduras en los tercios central y superior la lesión. LIAG es comúnmente positivo a los tipos virales oncogénicos que evitan la maduración y diferenciación, produciendo una replicación continua de células inmaduras y eventualmente la acumulación de anormalidades genéticas que favorecen la malignidad. La LIBG puede establecerse al inicio, al mismo tiempo o en ausencia de LIAG. (1)

El VPH tiene importancia por ser una de las infecciones más frecuentes a nivel mundial, que se presenta en la región ano-genital, en la vagina y en el cuello uterino. El comportamiento biológico de estos virus ha sido extensamente estudiado, debido a la asociación de estos con neoplasias (cáncer de vulva, de vagina, de cérvix y del canal anal). (11)

Se han identificado y caracterizado más de cien diferentes tipos de virus del papiloma humano, y a estos se les han asignado números, de los cuales los tipos 16 y 18 son los que más frecuentemente se aíslan de tejidos de cáncer del cérvix uterino (CACU), aunque también se han asociado los tipos 45 y 56. Se les denomina virus de alto riesgo. (11)

La existencia del virus se demostró por primera vez en 1949, con el uso del microscopio electrónico. En 1976 se identificó el papiloma plano, que es una lesión que se presenta en el cérvix uterino. En 1979 se demostró la heterogenicidad del virus. En 1983 se pudo aislar el genoma del VPH en tejido de cáncer de cérvix, por método de hibridación del ADN.

El tratamiento para esta infección es complejo, no existe antiviral específico y todas las modalidades terapéuticas tienen un alto índice de recidivas y muy probablemente no se erradica; lo mejor es la prevención con el uso del condón, mejores hábitos higiénicos y controles citológicos semestrales o anuales dependiendo de los factores de riesgo. (1)

Este tipo de infecciones se clasifica en: a) Latentes (asintomática): No tiene lesión visibles y son detectadas por técnicas moleculares; b)

Subclínica: se identifican por medio de colposcopia; c) Clínica: Se manifiesta como condiloma acuminado.

En las fases pre-clínicas es imprescindible tener un buen conocimiento de la historia natural de la enfermedad que nos ayude a seguir de cerca su proceso y actuar cuando sea necesario. En conjunto se considera que un 80-90% de las infecciones cervicales por VPH se resuelven espontáneamente y entre un 10-20% persisten. Para el desencadenamiento del proceso neoplásico es imprescindible la presencia continuada de la infección. La resolución de la infección parece ofrecer un cierto grado de protección ante reinfecciones por el mismo tipo de viral.

Los estudios de Bachatear y Van Der Graaf sugieren que la infección múltiple está asociada con un mayor riesgo de progresión de la enfermedad. (1)

Las verrugas genitales, o condilomas, se transmiten por contacto sexual, el 90% de estas son causadas por los tipos virales 6 y 11. (1)

El reconocimiento de una asociación etiológica entre el VPH y el cáncer de cérvix introdujo nuevas perspectivas en el campo del diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad, abordando el aspecto virológico.

La prevención del cáncer cervical se basa fundamentalmente en programas de tamizaje citológico y tratamiento de lesiones; sin embargo el uso de pruebas moleculares para la detección del genoma e VPH y el desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas ofrecerá importantes alternativas de control y prevención en el futuro.(2)

La contribución del esclarecimiento de los posibles marcadores de progresión en pacientes con LIBG constituye una prioridad tanto en el ámbito de la investigación como de la aplicabilidad clínica.

CAPITULO II

Epidemiologia

La principal vía de transmisión es la sexual (contacto directo). El cáncer cervicouterino es el segundo cáncer de la mujer en frecuencia en todo el mundo después del cáncer de mama y es el principal cáncer de la mujer en la mayoría de los países en vías de desarrollo, donde ocurre el 80% de los casos de CaCU. Se estima que causa alrededor de 500,000 muertes al año en todo el mundo. Su frecuencia es mayor en países en desarrollo. (10).

El 99.8% de los casos de CaCU se deben a tipos específicos de VPH (alto riesgo). La relación entre el cáncer cervicouterino y esta infección se demostró desde principios de los años 80's por el Dr. Harald zur Hausen. (1).

En los E.U. se estima que más de 20 millones de mujeres son portadoras de la enfermedad, con una prevalencia de la infección de 60-70% en mujeres de 15 años o más (2). La prevalencia e incidencia de infección por VPH en México es desconocida, debido a que esta infección no es de reporte ante las autoridades sanitarias sin embargo alrededor del mundo se sabe que en mujeres va de un 2% a un 44%, más alta entre mujeres jóvenes, decayendo conforme la edad aumenta.(1) Sin embargo algunos reportes indican que la prevalencia de esta infección en nuestro país es de alrededor de un 20% de la población abierta de bajo riesgo, y de un 43% en la población de alto riesgo.(11)

La infección genital por VPH es silente y representa la enfermedad de transmisión sexual más común a nivel mundial, siendo más frecuencia en África y América Latina; siendo los virus más frecuentes VPH-16,18,31,35,39,45,51,52,56 y 58. De estos el más frecuente en América Latina es el VPH-16. Numerosos estudios epidemiológicos mundiales confirmaron que infección genital por VPH es un factor necesario para el desarrollo del carcinoma cervical. (2)

En las mujeres jóvenes la frecuencia de infección con el virus de papiloma humano es muy alta; hasta el 50% de las mujeres adolescentes y adultas jóvenes adquieren la infección en los primeros 4 a 5 años de tener una vida sexual activa. De esta mujeres hasta un 25% de las que se infectan con el VPH desarrollan lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIBG). (10)

La incidencia de infección con tipos virales oncogénicos parece ser más alta que aquella con tipos virales no oncogénicos. La mayoría de las lesiones leves o moderadas revierten espontáneamente en individuos inmunocompetentes. Se sabe que más del 70% de las adolescentes sexualmente activas y mujeres jóvenes adquieren una infección por VPH. Sin embargo, la mayoría son transitorias y solo cerca del 25% desarrollan una lesión intraepitelial de bajo grado (LIBG por las siglas en inglés bajo el sistema Bethesda de clasificación de células displásicas cervicales). Después, solo del 20 a 40% de estas LIBG progresarán a lesiones intraepiteliales de alto grado (LIAG). Esto significa que aquellas mujeres que en alguna ocasión adquieren un VPH, solo el 5 o 10% de ellas desarrollarán una LIAG, mientras que cerca del 90% de las mujeres infectadas no mostrarán evidencia alguna del tipo viral adquirido después de 12 a 36 meses. Si el virus permanece en forma latente, una mujer que parece haber tenido una regresión de su infección entre sus visitas de seguimiento estaría aún en riesgo de desarrollar alguna lesión asociada al VPH.

La reducción de la incidencia CaCu es uno de los mayores logros en salud pública de los países desarrollados, y comienza a ser una realidad en algunos países como el nuestro, debido principalmente al incremento de programa de tamizaje en la población abierta, y en programas de detección temprana, así como tratamiento para las lesiones precursoras del cáncer (NIC). (11)

La neoplasia intraepitelial del cérvix se detecta generalmente en mujeres jóvenes muchos años antes de que se diagnostique un cáncer invasor del cérvix, y se considera que para que las lesiones se

transformen en un carcinoma invasor, se requieren aproximadamente 10-20 años. La mayoría de las lesiones de bajo grado tienden a desaparecer en forma espontánea; algunas persisten y otras progresarán a cáncer invasor. Estudios independientes demostraron que a 60% de los compañeros sexuales de personas con verrugas genitales las desarrollaban después de un periodo de incubación promedio de tres meses; pero puede variar de tres semanas a ocho meses.

La transmisión generalmente es de tipo sexual aunque se sugieren otros, como autoinoculación, fómites, iatrogénica durante la misma exploración ginecológica. Los condilomas acuminados afectan a ambos sexos, en tanto el condiloma plano rara vez da origen a condiloma florido en el hombre, en cambio en la mujer en la zona de transformación cervical puede llegar a evolucionar a un carcinoma.

La edad más frecuente en que se encuentran los condilomas es entre los 16 y 25 años, con predominio en mujeres blancas en relación a las negras 2:1, y se ha visto relacionado con la promiscuidad sexual, en hombre no hay diferencia, se desconoce la historia natural y establecer la forma de transmisión es difícil.

Factores de riesgo

La prevalencia de esta enfermedad varía de acuerdo al área geográfica, el estatus socioeconómico y las características de la población estudiada. Los factores de riesgo para la neoplasia intraepitelial del cérvix son los mismos que para la infección por el virus del papiloma humano. (11)

Los factores de riesgo para adquirir esta infección por VPH son: inicio de vida sexual a temprana edad, múltiples compañeros sexuales tanto de la mujer como de su pareja y deficiencia inmunológica.

Como ya se mencionó anteriormente solo una pequeña parte de las infecciones crónicas por VPH evolucionan de lesión intraepitelial de bajo grado (LIBG o NIC 1) a LIAG o NIC 2, NIC 3 y CaCU. Se han

encontrado algunos factores de riesgo asociados al VPH que son determinantes para que la infección por este evolucione hacia cáncer, los más importantes son: conducta sexual, consumo de tabaco, mujeres con alto número de embarazos, sistema inmunológico deprimido, uso prolongado de anticonceptivos y malnutrición. La conducta sexual es el principal factor de riesgo.

Al inicio precoz de relaciones sexuales (antes de los 20 años) y el número de compañeros sexuales aumentan el riesgo de cáncer cervicouterino. Se ha demostrado la presencia de VPH cervical o vulvar en el 17 a 21% de las mujeres con una pareja sexual y en 69-83% de las mujeres con 5 o más parejas sexuales (10).

La promiscuidad sexual del hombre también constituye un factor de riesgo dado que en sus múltiples contactos sexuales se contaminan con virus de papiloma humano que transmite después a su pareja.

En cuanto al consumo de tabaco, en estudios de investigación se ha encontrado que las mujeres fumadoras tienen mayor riesgo que las mujeres no fumadoras, ya que se han encontrado una concentración muy elevada de sustancias del tabaco en el moco cervical. Referente al alto número de embarazos, los cambios hormonales que ocurren durante el embarazo favorece el desarrollo de las infecciones por VPH. Factores genéticos o enfermedades como el SIDA, medicamentos, consumo de drogas, etc. que provocan la depresión del sistema inmunológico de las personas predisponentes al desarrollo de cáncer ano-genitales y del cuello uterino ante la presencia de la infección por virus de papiloma humano.

El uso prolongado de anticonceptivos se ha vinculado con la persistencia de infecciones por VPH. Estudios científicos han estimado que las mujeres que utilizan anticonceptivos orales por más de 5 años duplican el riesgo de contraer cáncer cervicouterino.

Aunque no son concluyentes los estudios científicos en cuanto a nutrición, se considera que una dieta baja en antioxidantes, ácido fólico y vitamina C favorece la persistencia de la infección por VPH y la evolución a lesiones malignas.

Patogenia:

Los virus del papiloma humano que pertenece a la familia de los Papillomaviridae, son virus con ADN de doble cadena, y solo infectan a los humanos. Algunos tienden a infectar a las mucosas y los otros a la piel.

Las partículas infecciosas entran a las células basales o germinales a través de una abertura en el epitelio estratificado. Tal abertura puede ocurrir en condiciones donde la piel tenga alguna lesión o microtrauma. Para los VPH/AR como los tipos 16 y 18 (más frecuentes), la formación de lesiones cervicales se facilita por la infección de células columnares que después formarán la capa basal del epitelio estratificado de la zona de transformación.

La internalización del virus ocurre por endocitosis de vesículas cubiertas de clatrina. El desensamble del virión puede ser a través del rompimiento de enlaces disulfuro internos de la cápside, dado el ambiente reductor de la célula, lo que permitiría el transporte del DNA viral al núcleo de esta. (1)

La severidad del trauma o erosiones epiteliales y la inducción de hiperplasias epidérmicas antes de la infección, son factores locales importantes que favorecen el crecimiento viral. El proceso de infección ocurre fundamentalmente, a través de receptores de integrinas presentes en las células basales. (13)

En el núcleo de la célula hospedera el virus se replica en una relación 25-50 genoma/células, mediado por la actividad de 4 proteínas multifuncionales: E1/E2, E6 y E7.

E1/E2: región que generalmente se rompe cuando el genoma viral se integra en el genoma hospedero. La disrupción de E2 libera los promotores virales de las oncoproteínas E6 y E7 e incrementa la expresión de estos genes transformantes.

E6: oncoproteína que se une al producto génico del gen supresor de tumor: p53 (proteína activada por la fosforilación de proteínas sensibles al daño del ADN), formando un complejo E6-p53 que es blanco posterior para la degradación, y provoca fallos en los mecanismos de proliferación y apoptosis. (13)

La E6 sintetizada por los VPH-6 y VPH-11 muestra una significativa disminución en la capacidad de unión a la p53, lo que podría explicar la asociación menos transformante de estos para la célula.

E7: Oncoproteína que promueve la transcripción viral por 2 vías; uniéndose al producto génico del gen del retinoblastoma, liberándose el factor de transcripción E2F tanto en el virus como en la célula; o activando determinados complejos de ciclina, como la p33-dependiente de quinasa 2, la cual controla la progresión del ciclo celular. La respuesta de las células infestadas ante este fenómeno es la producción de un inhibidor de ciclina quinasa, gran cantidad de E7 puede unirse y bloquear la actividad del inhibidor. Las cantidades relativas de E7 y p21cip1 determinan cuándo la célula entra en fase S del ciclo celular y replica el ADN viral o cuándo bloquea la producción del virus. La célula donde E7 se une a p21cip1 se convierte en koilocito y produce partículas virales. (13)

Normalmente la proteína p53 activada es requerida para detener el ciclo celular en fase G1 como resultado de estimulación directa a p21cip1. Cuando los daños en el ADN son más severos o cuando hay una gran replicación viral, p53 puede activar la vía apoptótica.

En las lesiones persistentes, el genoma viral continúa estimulando a las células basales y a ignorar el daño en el ADN, que por consiguiente, se van acumulando. La estimulación por E6 y E7 de los VPH de alto riesgo produce lesiones con una larga vida media, pasando al punto conocido como de mortalidad 1, donde aún las células no son inmortales. (11)

Después de la infección sólo un pequeño número de genes virales persisten en la membrana basal. Se acumula el ADN del virus en la superficie epitelial con aumento de su replicación y son expresados diferentes mensajeros. Las proteínas virales son sintetizadas y el ADN replicado es empacado en las proteínas de la cápside viral, liberándose así las partículas de infección a la superficie de la epidermis. Todo esto constituye un período de incubación viral, que tiene una duración de 3 a 4 meses.

El genotipo viral es uno de los factores de riesgo asociados a la infección que determinan la progresión maligna de lesiones cervicales. Más de 40 tipos distintos de VPH han sido identificados en el tracto ano genital humano, los cuales se pueden subdividir en dos grupos: “de bajo riesgo oncogénico” (VPH-BR) que se encuentran en condilomas acuminados y neoplasias intraepiteliales de bajo grado con mínimo riesgo de progresión maligna (principalmente los tipos 6, 11 y 42) y los “de alto riesgo oncogénico” (VPH-AR) en neoplasias intraepiteliales de alto grado e invasivas (principalmente los tipos 16, 18, 31 Y 45) (12,19,30).

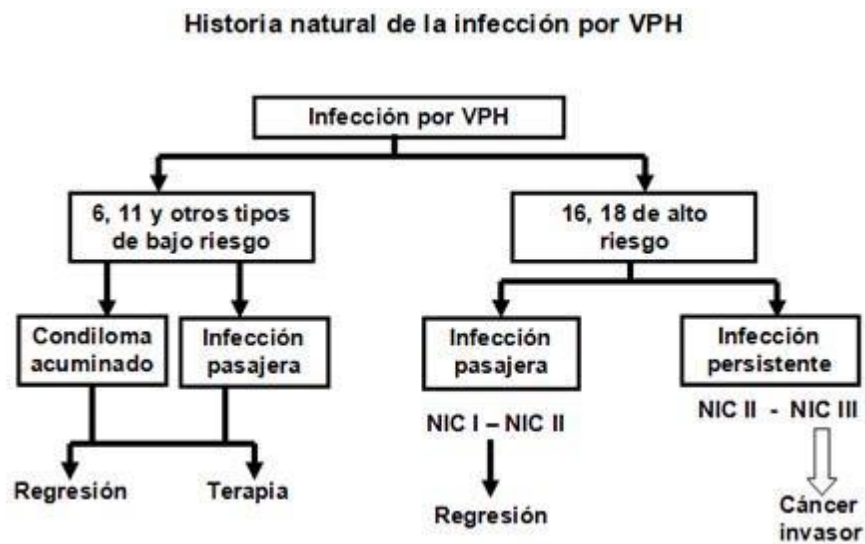
Como ya se mencionó anteriormente, la prevalencia de la infección por VPH en relación en el número de compañeros sexuales. La mayor parte de las infecciones por VPH son transitorias y autolimitadas, y tienden a desaparecer en los siguientes 6 a 18 meses, y entre el 80 y 90% de los casos se resuelven a los dos años particularmente en mujeres jóvenes.

Los posibles escenarios clínicos que se pueden presentar después de una infección por VPH son: una infección permanente asintomática latente, o una infección que puede permanecer activa, en este caso el VPH sufre replicación, pero no integración en el genoma, lo que ocasiona el desarrollo de verrugas en los genitales externos, y lesiones precursoras de Cáncer (NIC1).

Es importante mencionas que la mayoría de las mujeres infectadas con VPH no desarrollan cáncer, la infección por sí misma no es un efector suficiente; sería necesaria la presencia de otros cofactores que

intervienen en la desregulación inmunológica, y en la inducción de mutaciones genéticas. Algunos de estos factores son: el tabaquismo, la deficiencia de antioxidantes y folatos, hormonas y la presencia de otras infecciones como el herpes o clamidia.

La persistencia de infecciones por VPH de alto riesgo es el factor más importante para que progrese una lesión de bajo grado (NIC1) a lesión de alto grado (NIC 3) y cáncer invasor. (11)



Diagnostico:

El diagnostico de las infecciones por VPH comienza con el examen clínicos y estudios citológicos o histopatológico de las lesiones sospechosas en la región ano-genital o exámenes citológicos del cérvix, y pruebas moleculares para la detección del DNA del virus. Las dos pruebas moleculares que con mayor frecuencia se empleas son la captura de híbridos (CH2) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La citología de cérvix (Papanicolaou) es el método que se emplea rutinariamente para detectar la enfermedad por VPH, tanto en el cérvix, como en la vagina. La presencia de koilocito (células características de la infección por VPH), además de una atipia nuclear son los hallazgos en la citología que nos hace pensar en una infección por VPH, y esto se

correlaciona bien con la presencia de ADN del virus en las pruebas moleculares (CH2, PCR)

Cuando la citología es positiva para este tipo de lesiones en el cérvix, la colposcopia es mandatoria, en estas pacientes deberá realizarse una biopsia dirigida con el colposcopio para correlacionar los resultados de la citología con la colposcopia y la histopatología. (11)

El diagnóstico de las pacientes con neoplasia intraepitelial cervical se establecerá cuando en el resultado de la citología (Papanicolaou) se informe sobre la presencia de células sugestivas de infección por VPH y alteraciones en las células que sugieren una lesión precursora del cáncer. Generalmente no existen síntomas, debido a que las lesiones son intraepiteliales.

Tampoco es frecuente que se presenten síntomas cuando se establecen las etapas tempranas del cáncer invasor en el cérvix. Los síntomas pueden aparecer en las etapas más tardías, sin embargo el aspecto del cuello uterino puede variar desde un cérvix que aparenta ser normal, asociado a una citología de cérvix (Papanicolaou) anormal, hasta un cérvix que microscópicamente, puede estar reemplazado totalmente por un tumor,

Detección de secuencias genómicas del VPH (técnicas de biología molecular).

Estas técnicas consisten en un análisis cualitativo de DNA. Todas ellas se basan en la detección específica de secuencia de DNA de VPH en tejido o bien en tomas de material procedente del área a estudiar (cérvix), y permiten por lo tanto, identificar el tipo de virus presente en la lesión. Básicamente, todas ellas consisten en enfrentar el DNA de una determinada muestra con un fragmento conocido de un ácido nucleico cuya secuencia es complementaria de la secuencia de DNA que intentamos detectar. Dicho fragmento conocido se denomina *sonda* y el proceso *hibridación*.

Existen numerosas técnicas de análisis cualitativo del DNA y una gran diversidad de variaciones y modificaciones de estas técnicas. Estas

diferentes técnicas presentas entre ellas diferencias en cuanto a su sensibilidad, complejidad, y reproductibilidad. Algunas de ellas se encuentran disponibles comercialmente. Las siguientes técnicas de biología molecular son las más empleadas en el estudio del VPH: 1) Hibridación *in situ*; 2) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR); 3) Captura de Híbridos.

Hibridación *in situ*:

La hibridación *in situ* consiste en aplicar sondas complementarias marcadas con sustancias radioactivas o con colorantes que permitan su posterior visualización sobre un corte del tejido problema o sobre una extensión citológica. Esta técnica se puede aplicar tanto en toma citológica, como en biopsias, tras su procesamiento habitual. Existen varios test de detección del VPH por hibridación *in situ* comercializados. Estas pruebas pueden ser de cribado, los cuales incluyen un cóctel de sondas que permite detectar a un amplio grupo de tipos sin diferenciarlos, o de tipificación. Las pruebas de tipificación comercializados incluyen tres sondas cada una de las cuales detecta a dos o más tipos de virus agrupados según el riesgo de desarrollo de neoplasia (sonda 6-11 de virus de bajo riesgo, sonda 16-18 de virus de alto riesgo, y sonda 31-33-51 o de riesgo intermedio),

La principal ventaja de este método, es que es el único que permite visualizar la morfología de las células en las que se halla el VPH, mientras que las otras técnicas se realizan en extractos de DNA, por lo que no permiten la valoración morfológica. La segunda ventaja es su gran especificidad: la detección del VPH mediante esta técnica se asocia constantemente a la presencia de lesiones citológicas e histológicas. Las infecciones latentes (con epitelio normal) son casi constantemente negativas con esta técnica.

El inconveniente de esta técnica es su baja sensibilidad, ya que se requieren de un elevado número de copias (entre 20 y 25 en cada célula) para ser positivo. Esta técnica es capaz de detectar tipificar el virus

solamente en un 40-70% de las lesiones intraepiteliales escamosas (SIL). (5)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

Este método consiste en la aplicación de un proceso que multiplica el número de copias de un segmento de DNA si está presente en la muestra. Este proceso, que se conoce como amplificación se produce mediante la reacción en cadena de la polimerasa, hace que sea una técnica extraordinariamente sensible capaz de detectar la presencia de muy pocas copias de DNA del virus (entre 10-100 en una muestra). Aunque estén presentes en una sola célula entre varios miles.

Las técnicas basadas en las amplificaciones por PCR son rápidas y relativamente poco laboriosas. Pueden ser realizadas con el mismo material recogido en el momento de la toma citológica y no requiere de más molestias para la mujer que está siendo estudiada. Estas técnicas son muy sensibles capaces de detectar lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado no detectados con la citología; también detecta gran número de pacientes con infecciones no progresivas y a mujeres con infecciones latentes sin alteraciones citológicas, que en gran parte se resuelven en forma espontánea. Sin embargo no permite cuantificar adecuadamente el DNA viral presente en la muestra. Otro de sus defectos es la elevada probabilidad de contaminaciones y falsos positivos.

Captura de Híbridos:

En esta técnica se utilizan sondas de RNA capaces de detectar varios tipos de VPH. Cuando la muestra presenta infección vírica se produce un híbrido RNA-DNA que es capturado por un anticuerpo específico contra híbridos y detectado mediante una reacción tipo ELISA que utiliza un compuesto quimioluminiscente para revelar la reacción y además proporciona información sobre la cantidad de DNA viral presente en la muestra, que parece tener relación con la presencia de lesiones de alto grado.

La técnica dispone de dos sondas, una para virus de bajo riesgo y otra para virus de alto riesgo, aunque una práctica habitual consiste en aplicar únicamente la sonda para detección de virus de alto riesgo con lo cual se reduce notablemente de costo. La prueba de Captura de híbridos 2 permite detectar cinco virus de bajo riesgo (6,11,42,43,44) y 13 tipos de riesgo alto o intermedio (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68), involucrados en el 99% de casos de carcinoma de cérvix. (6)

Esta prueba (CH2) para virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) es capaz de detectar con gran sensibilidad los casos de lesión intraepitelial de alto grado (LIAG) o carcinoma con un 94.7% de casos positivos. Así la sensibilidad de esta técnica para el diagnóstico de LIAG es netamente superior la sensibilidad de la citología convencional, que se sitúa en la mayoría de las series alrededor del 70%. (6)

Resulta especialmente detectable el alto valor predictivo negativo de esta técnica para la existencia de LIAG o carcinoma. Por tanto, la detección de VPH-AR mediante la captura de híbridos es de utilidad en la evaluación de pacientes referidas por lesiones citológicas, puesto que su negatividad permite excluir con un elevado grado de certeza la existencia de una lesión premaligna de alto grado o de un carcinoma invasor. (6)

CAPITULO III

Planteamiento del problema:

Se utilizara el método de captura de híbridos (CH2) para detectar VPH de alto riesgo que se encuentran en las lesiones intraepiteliales de bajo grado (ILSIL) diagnosticadas por citología, y así evaluar la prevalencia del VPH de alto riesgo en estas lesiones.

Justificación:

La asociación que existe entre la infección por el VPH de alto riesgo y el CaCU es muy alta. Este tipo de virus (de alto riesgo) es frecuente que se encuentren en lesiones de alto grado; aunque existen reportes que se han identificado genotipos de VPH de alto riesgo en lesiones de bajo grado.

La citología cervical es un estudio de rutina que detecta una lesión cervical característica o que hace pensar en una infección por VPH, mas no determina si el virus es de bajo o alto riesgo para evolucionar a malignidad; por lo que es necesario que la citología cervical tenga estudios complementarios como la colposcopia y la pruebas moleculares para llegar a un diagnostico preciso en etapas tempranas y así llevar a cabo un manejo y tratamiento adecuado.

CAPITULO IV

Objetivo general:

Detectar a las pacientes con más riesgo para desarrollar CACU, y determinar la prevalencia de los VPH de alto riesgo en las lesiones cervicales de bajo grado por el método de captura de híbridos (CH2).

Objetivos específicos:

Seleccionar a las pacientes con infección por VPH de alto riesgo para su tratamiento adecuado.

Hipótesis:

La prevalencia de virus de alto riesgo en lesiones de bajo grado, es significativa al determinar la presencia de estos por la prueba molecular de la captura de híbridos.

La prueba de captura de híbridos determina con certeza la presencia o la ausencia de VPH de alto riesgo.

CAPITULO V

Diseño:

Se trata de un estudio transversal, que se realizo en el periodo comprendido entre Febrero de 2009 a Septiembre de 2009, en la Clínica de Displasias del Hospital General de Tijuana con pacientes de la consulta de primera vez con diagnostico citológico de lesión intraepitelial de bajo grado (LIBG)

Material y Métodos:

1. Universo del estudio:

Todas las mujeres de consulta de primera vez de la clínica de displasias con diagnostico citológico de LIBG en el periodo de Febrero de 2009 a Septiembre de 2009.

2. Tamaño de la muestra:

Se incluyeron en el estudio 53 pacientes que cumplen con los criterios de inclusión.

3. Criterios de Inclusión:

Pacientes de primera vez con diagnostico citológico de LIBG.

4. Criterios de Exclusión:

- a) Antecedentes de lesiones de alto grado detectadas por citología.
- b) Pacientes con diagnostico citológico de LIAG.
- c) Pacientes con seguimiento por tratamiento de lesiones de bajo grado.
- d) Pacientes con seguimiento de lesiones de alto grado.
- e) Pacientes que no puedan realizarse el estudio de captura de híbridos.

5. Criterios de Eliminación:

No contar con el resultado de la Captura de híbridos.

6. Variable dependiente:

VPH de alto riesgo

7. Variable independiente:

- a) Edad
- b) Número de parejas sexuales
- c) Inicio de vida sexual activa
- d) Citología
- e) Colposcopia
- f) Lesión intraepitelial de bajo grado
- g) Captura de Híbridos

8. Recursos materiales disponibles:

- Mesa de exploración ginecológica
- Colposcopio
- Espejo vaginal desechable
- Pinza uterina
- Torundas de algodón
- Cepillo con muesca
- Tubo de ensaye con 1ml de solución transportadora

9. Procedimiento para la toma de la muestra para el método de Captura de Híbridos:

Se tomó una muestra exocervical con espátula de Ayre y un hisopado endocervical (hisopo de dacrón) para la citología cervical de acuerdo a la técnica de Papanicolaou y evaluada según los criterios pautados por la clasificación de Bethesda. Se tomo una muestra endocervical, exocervical y de la zona de transformación, para captura de híbridos 2 (CH2), se insertar el cepillo 1-1.5 cm en el canal y con las cerdas más largas del cepillo tocar el exocervix, realizando tres rotaciones completas, posteriormente colocar la cabeza del cepillo en el tubo transportador. El material obtenido a temperatura ambiente se lleva al laboratorio para su procesamiento de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Luego de la desnaturalización calórica y alcalina, el ADN liberado se hibridó por separado con una mezcla de sondas de ARN de VPH de alto riesgo (VPH 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59 y 68).

10. Análisis estadístico:

Se creó una base de datos en el programa Microsoft office Excel; el análisis se realizó con cálculo de estadísticas descriptivas básicas. Con las siguientes proporciones:

- Prevalencia del VPH en citologías con LIBG
- Proporción de VPH/AR en Citologías
- Proporción de mujeres con CH2(+)
- Proporción de VPH/AR en mujeres con IVSA antes de los 20 años de edad
- Proporción de VPH/AR de acuerdo al número de parejas sexuales
- Prevalencia de lesiones alto grado diagnosticadas por biopsia.

CAPITULO VI

Resultados:

De un total de 199 mujeres que acudieron a consulta de primera vez a la clínica de displasias, se seleccionaron 60 pacientes con diagnóstico citológico de lesión intraepitelial de bajo grado (LIBG), de estas pacientes se excluyeron 7 por no contar con resultado de la prueba molecular (no se la realizaron la prueba). La muestra de nuestro estudio quedo con 53 pacientes.

Las edades de las participantes están entre los 18 y 63 años con un promedio de edad de 39.1 años. El grupo mayor es el de las pacientes menores de 30 años (16 pacientes) seguidas del grupo de los 41 a 50 años de edad (13 pacientes) y en tercer lugar el grupo de los 31 a 40 años (11 pacientes). Fig.1

Distribución de edades por décadas

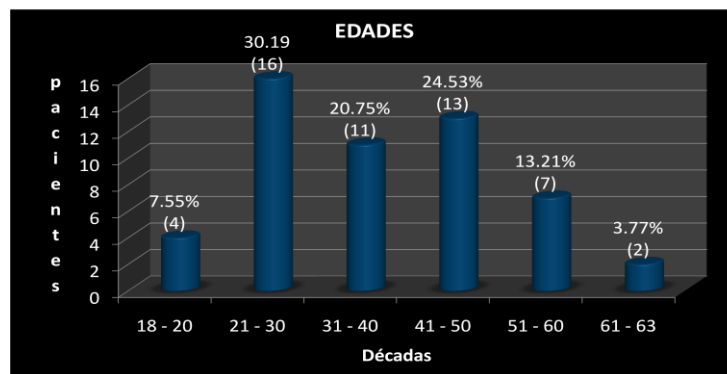


Fig.1

De las 53 pacientes a las cuales se les realizo la prueba de Captura de Híbridos para VPH de alto riesgo, el 58.50% (n=31) resulto positiva y el 41.50% (n=22) resulto negativa. Fig.2

Distribución porcentual de casos con citología con LIBG según resultados de CH2 para VPH/AR

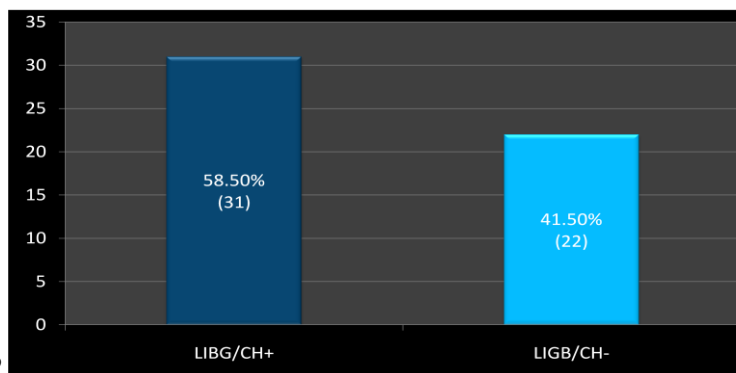


Fig.2

La distribución porcentual de casos con captura de híbridos positiva en las pacientes con inicio de vida sexual activa antes de los 20 años de edad (n=23) fue del 56.52% (n=13) en el grupo de edad de 31 a 50 años, seguido por el grupo de las menores de 30 años con el 25.80% (n=8), y de las pacientes de 51 años en adelante fue del 6.45% (n=2); en tanto que las que iniciaron su vida sexual después de los 20 años de edad (n=8), el 50% (n=4) de estas se encuentra en el grupo de 51 años en adelante, seguida por el grupo de las menores de 30 años con el 37.5% (n=3), y en el grupo de 31 a 50 años el 12.5% (n=1). Por lo anterior se concluye que el mayor porcentaje de las pacientes inicio su vida sexual antes de los 20 años. Fig.3

Distribución porcentual de casos de VPH/AR comprobada por CH2 según el grupo de edad de IVSA

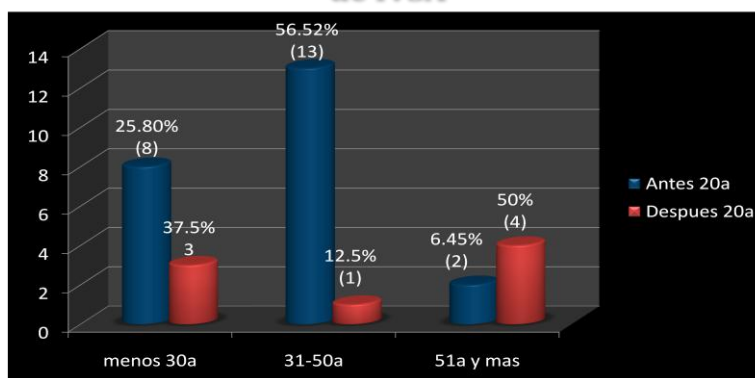


Fig.3

De las 31 pacientes con captura de híbridos positiva para VPH-AR, 93.5% (n=29) reunieron los criterios para realizarles biopsia de cérvix; el 45% resultaron con

LIBG y el 48% LIAG (incluidas displasias moderada y severa, cáncer in situ e invasor). Fig.4

Prevalencia de LIAG diagnosticada por biopsia

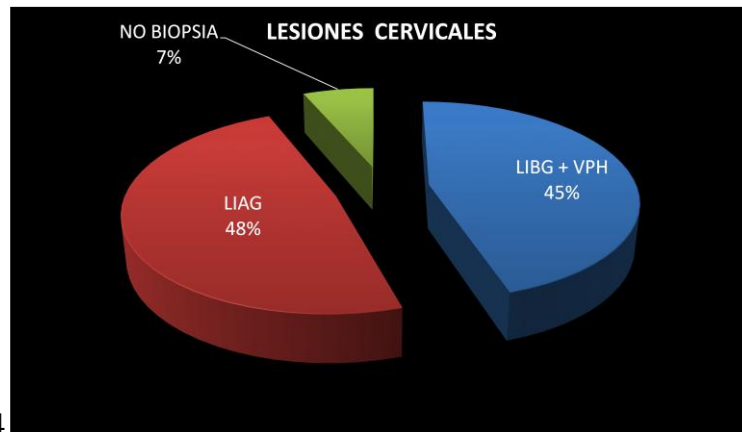


Fig.4

De las 29 pacientes con resultados histopatológicos y captura de híbridos para VPH-AR positiva, 14 resultaron con LIBG, 14 con LIAG (incluidas displasias moderada y severa, y cáncer in situ) y 1 con cáncer invasor. Fig.5

Resultados histopatológico en pacientes con CH(+)

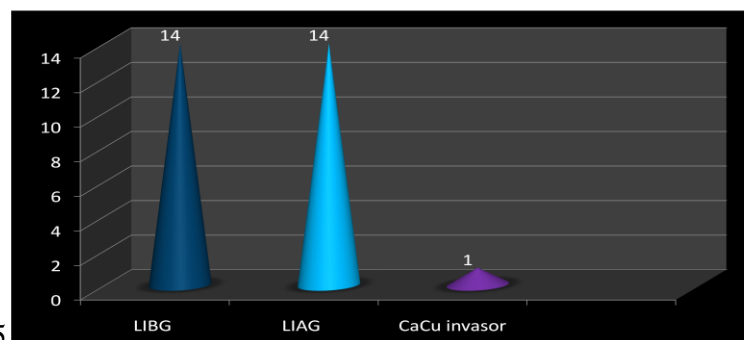


Fig.5

De acuerdo a la relación entre los resultados histopatológicos (n=29) y el número de parejas sexuales fue el siguiente: De las 17 pacientes que resultaron son LIBG 10 se encuentran en el grupo que refirió solo una pareja sexual, seguido por 4 que refirieron 2 parejas sexuales; 7 de las pacientes resultaron son LIAG (incluyendo en estas displasia moderada y severa) 3 refirieron haber tenido 4 parejas sexuales; 4

pacientes que resultaron con cáncer in situ refirieron 2 parejas sexuales; y la única paciente con cáncer invasor refirió 3 parejas sexuales. Fig.6

Distribución de resultados histopatológicos en relación al número de parejas sexuales

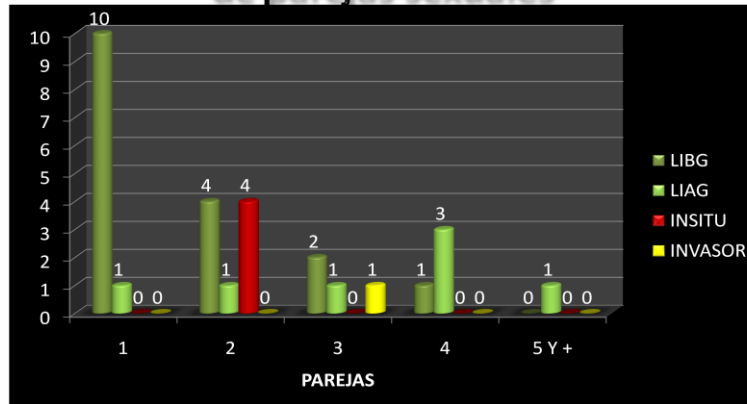


Fig.6

CAPITULO VII

Discusión:

La infección por virus del papiloma humano (VPH) en el cuello uterino es por contacto sexual y puede generar lesiones clínicas, subclínica o latentes. El diagnóstico se establece tradicionalmente con el examen clínico, colposcopia, citología cervical (Papanicolaou) y estudio histopatológico, sin embargo en la actualidad cada vez es más frecuente utilizar métodos biomoleculares como la captura de híbridos, para detectar y tipificar al VPH con excelente sensibilidad y especificidad. (8)

El cáncer cervicouterino está relacionado con la infección por VPH en 99.8% de los casos; los tipos de VPH de alto riesgo pueden ser la causa de que se formen células anormales en el cuello uterino, y estos cambios celulares se pueden convertir paulatinamente en cáncer cervical si no se remueven. Los tipos de VPH-AR que causan mayor preocupación son los conocidos con los números 16,18,31,33, 35,39,45,51,52,56,58,59 y 68. Los tipos 16 y 18 son los más peligrosos ya que causan el 70% de los cánceres cervicales. (3)

Debido a la baja sensibilidad de la citología cervical y a las fallas diagnósticas rutinarias para la detección de la infección por VPH que pueden causar lesiones que evolucionen a cáncer cervicouterino, algunos autores consideran fundamental la inclusión de las pruebas moleculares a las pacientes que acuden a la consulta para detección oportuna del cáncer cervicouterino y que se tenga la sospecha que hay una lesión compatible con la infección por VPH.

En el presente estudio con muestras de 53 pacientes, el 58.5% (n=31) de estas con LIBG resultó con la prueba de captura de híbridos positiva, y de estas a 29 pacientes se les realizó biopsia.

Se observó que el 48% de las pacientes que habían acudido a la consulta de primera vez a la clínica de displasias del Hospital General de Tijuana con citología cervical anormal (con LIBG) en las cuales la captura de híbridos resultó positiva a VPH-AR, posteriormente se le realizó colposcopia y fue candidata a que se realizara biopsia, siendo su resultado final una LIAG de las cuales cuatro ya tenían cáncer in

situ y una cáncer invasor; y no se habían diagnosticado tempranamente por la citología la presencia de VPH-AR en la lesión de bajo grado, motivo por el cual no se les había podido iniciar el manejo y tratamiento adecuado antes de evolucionar a una lesión precursora de cáncer cervicouterino o al mismo cáncer cervicouterino.

Es conveniente la utilización de este método molecular que es la captura de híbridos para poder agilizar y afinar el diagnóstico para realizar de manera precoz las medidas terapéuticas efectivas.

CAPITULO VIII

Conclusiones:

Por tener una positividad tan elevada el método por Captura de Híbridos (72.09% en nuestro estudio), permitió identificar al 48% de las pacientes con LIAG que no pudieron ser identificadas por citología cervical (Papanicolaou).

Algunos metaanálisis reportan que la sensibilidad de la citología cervical es del 50%, en cambio la sensibilidad de la Captura de Híbridos (CH2) es del 96 al 98%.

La citología de células cervicales es un método subjetivo y poco sensible para establecer el diagnóstico de infección por VPH

La detección del VPH-AR por captura de híbridos es un método sensible para evidenciar infecciones latentes o lesiones cervicales subclínica y puede ser útil en la identificación de lesiones con tipos específicos de VPH y el riesgo de desarrollar cáncer cervical.

La unión de la citología cervical y la captura de híbridos permiten seleccionar a las pacientes; de tal manera que la positividad a VPH-AR amerita un envío inmediato a las clínicas de displasia y su negatividad un control en los centros de salud.

Este estudio molecular (CH2) debe de ser un complemento de la citología cervical y así poder hacer un diagnóstico temprano de las LIAG.

El método de captura de híbridos no puede ser utilizado como tamizaje por su elevado costo.

BIBLIOGRAFIA:

1. Alejandro López Saavedra, Marcela Lizano Soberón: Cáncer Cervicouterino y el Virus del Papiloma Humano: Historia que no termina; *Cancerología* 1 (2006) 31-55.
2. C.C. Sijvargerm, J.V. González, A. Prieto, A.G. Messmer, M. C. Mallimaci, V.L. Alonio: Epidemiología de la infección cervical por Virus del Papiloma Humano en Argentina; *Revista argentina de Microbiología* (2006)38:19-24
3. Jorge García Tamayo, Julia Molina, Eduardo Blasco Olaetxea: Importancia de los estudios de inmunobioquímica en el diagnóstico y la evaluación pronóstica de la neoplasia intraepitelial y el cáncer cervical. Revisión; *Invest. Clin.* 50 (2): 241-250, 2009.
4. René Rivera Z., Jorge Aguilera T.: Epidemiología del Virus del Papiloma Humano; *Rev. chil. obstet. ginecol.* V.67 No 6 Santiago 2002.
5. Hubbard R.A.: Human Papillomavirus Testing Methods; *Archive of Pathology Laboratory Medicine*, Agosto 2003.
6. Dr. Jaume Ordi: Virus del Papiloma Humano y Carcinogénesis cervical; Carcinogénesis cervical y Virus del papiloma humano, Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Clínica de Barcelona.
7. Arturo Barrón, Carlos Aranda, Sergio Valenzuela, Yuridia Paredes, Hilda Villegas: Infección cervical por virus del papiloma humano: genotipificación por hibridación *in situ* y análisis ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión; *Perinatol Reprod Hum* 2004; 18:208-216.
8. José Andrés Mendoza, Maritza Muñoz, Silvana Vielma, María Eugenia Noguera, Mercedes López, Morelba Toro: Infección cervical por el virus del papiloma humano: Diagnóstico por citología y por captura de híbridos del ADN viral; *Rev. Obstet. Ginecol. Venez.* 2000, 60(2):103-107.
9. MP. Cañadas, Lloveras B., Lorincz A., Ejarque M.: Evaluación de las técnicas de detección del virus del papiloma humano en los programas de cribado para cáncer de cuello uterino; *Salud Publica Mex* 2006; 48: 373-378.
10. Rousemary: Epidemiología del virus del papiloma humano; Febrero 2009 23:37
11. Dr. Salvador B. Valdovinos Chávez: Trabajo de revisión bibliografía; 2008
12. Ola L. Rincón, BSc, Luis René Pareja, M.D., Sergio Jaramillo, M.D., Beatriz H. Aristizábal, , MSc, : Virus del papiloma humano, respuesta inmune y Cáncer cervical: Una relación compleja; *Revista Colombiana de Obstetricia Ginecología* Vol. 58 No. 3 2007 pag. 202-212.
13. Lic. Grettell León Cruz y Dr. Omar de Jesús Bosques Diego: Infección por el virus del papiloma humano y factores relacionados con la actividad sexual en la génesis del cáncer de cuello uterino; *Rev. Cubana Obstet Ginecol*, 2005; Instituto nacional de oncología y radiología.