



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

***“Genotipificación del Virus del Papiloma Humano
en muestras de citología cervical recibidas en el
CICMED”***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Químico Farmacéutico Biólogo

PRESENTA

Maribel López Esquivel

DIRECTOR

**Dr. en C. Q. Jonnathan Guadalupe Santillán
Benítez**

ASESOR

Dra. en C. Q. Victoria Domínguez García



Toluca, Edo. de México a 26 de febrero de 2018

El presente trabajo derivó del macroproyecto “Genotipificación y factores predisponentes en la infección del virus del papiloma humano y su asociación con el marcador tumoral CA-125”, con número de registro 2902/2010UAEMéx-SEIA, el cual se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Ciencias Médicas (CICMED) de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx).

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ABREVIATURAS	7
SÍMBOLOS.....	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
CAPITULO I. MARCO TEÓRICO.....	12
1.1 Antecedentes	13
1.2 Historia del descubrimiento de la asociación del VPH con el desarrollo del CaCu.	15
1.3 Generalidades del VPH	16
1.4 Ciclo Viral	22
1.5 Aspectos clínicos	24
1.6 Oncogénesis	26
1.7 Factores de riesgo	27
1.8 Frecuencia de infección por VPH a nivel mundial y en México	28
1.9 Métodos de Diagnostico.....	31
1.10 Vacuna	38
CAPITULO II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS	40
2.1 Planteamiento del problema	41
2.2 Pregunta de Investigación	42
2.3 Objetivos.....	42

CAPITULO III. METODOLOGÍA.....	43
3.1 Diseño del estudio	44
3.2 Tamaño de la muestra	44
3.3 Área de trabajo	44
3.4 Criterios	44
3.5 Conceptualización de variables.....	45
3.6 Procedimiento.....	46
3.7 Implicaciones éticas.....	49
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
4.1 Frecuencia de infección por VPH	51
4.2 Genotipos de VPH detectados y su frecuencia	53
4.3 Frecuencia de genotipos de alto y bajo riesgo oncogénico	58
4.4 Comparación entre el resultado por genotipificación y el diagnóstico por colposcopia	60
4.5 Frecuencia de mono-infección y coinfección	61
CAPITULO VI. CONCLUSIONES	62
CAPITULO VII. REFERENCIAS.....	62
CAPITULO VIII. ANEXOS.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Figura 1. Árbol filogenético con 118 tipos de VPH.	17
Figura 2. Microfotografía electrónica del VPH con tinción negativa.	18
Figura 3. Mapa genético del VPH 16.	20
Figura 4. Mapa genético de la Región Larga de Control de los VPH.	21
Figura 5. Ciclo viral del VPH en el epitelio estratificado.	23
Figura 6. Desarrollo de Cáncer Cervicouterino.	26
Figura 7. Mecanismo teórico de carcinogénesis cervical por infección de VPH.	28
Figura 8. Casos por año de infección por VPH en población femenina (2003-2013).	32
Figura 9. Diagrama de clasificación de pruebas moleculares para detección de VPH.	35
Figura 10. Diagrama general de las etapas del estudio.	48
Figura 11. Frecuencia de mujeres mexiquenses infectadas por VPH.	52
Figura 12. Frecuencia en estudio de cada genotipo de VPH detectado en las muestras.	54
Figura 13. Resultado de los genotipos de VPH encontrados de acuerdo a su riesgo oncogénico.	59
Figura 14. Resultado de la distribución del VPH acuerdo al tipo de lesión intraepitelial escamosa.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Tabla 1. Estudios sobre frecuencia y genotipos de VPH en México.	14
Tabla 2. Características y funciones de las estructuras del VPH.	18
Tabla 3. Clasificación de genotipos de VPH con base en su nivel de riesgo oncogénico.	19
Tabla 4. Funciones de los genes del VPH.	22
Tabla 5. Equivalencia de los principales sistemas de clasificación de las lesiones precancerosas del cérvix.	27
Tabla 6. Casos por año de infección por VPH en población femenina (2003-2013).	31
Tabla 7. Genotipos de VPH detectados por diferentes sistemas moleculares.	38
Tabla 8. Tipos de Vacunas para prevención de infección por VPH.	40
Tabla 9. Manejo de variables.	46
Tabla 10. Frecuencia de genotipos de alto y bajo riesgo oncogénico en las muestras analizadas.	60
Tabla 11. Número de genotipos de VPH identificados en las muestras.	63

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

CaCu: Cáncer Cervicouterino

CICMED: Centro de Investigación en Ciencias Médicas

CPA: Célula Presentadora de Antígeno

CV: Carga Viral

FDA: Administración de Alimentos y Medicamento

HC2: Captura de Híbridos de Segunda Generación

HMPMP: Hospital Materno Perinatal Mónica Pretelini

HSIL o LIEAG: Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado

IFCPC: Federación Internacional de Patología Cervical y Colposcopia

INSP: Instituto Nacional de Salud Pública

LCR: Región Larga de Control

LSIL o LIEBG: Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical

OMS: Organización Mundial de Salud

Pap: Papanicolaou

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

P_E: Promotor temprano

P_L: Promotor tardío

Rb: Retinoblastoma

RFLP: Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción

RLU: Unidades Relativas de Luz

RPM: Revoluciones Por Minuto

SIL: Lesión Intraepitelial Escamosa

SUIVE: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica

UAEMéx: Universidad Autónoma del Estado de México

VLP: Partículas Parecidas a los Virus

VPH: Virus del Papiloma Humano

VPH-AR: Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo

VPH-BR: Virus del Papiloma Humano de Bajo Riesgo

SÍMBOLOS

°C: Grados centígrados

mL: Mililitros

KDa: Kilo Dalton

nm: Nanómetro

Kpb: Kilo pares de bases

pg: Picogramo

µg: Microgramos

s: Segundos

µL: Microlitros

T: Temperatura

min: Minuto

RESUMEN

Antecedentes. La infección producida por el Virus del Papiloma Humano (VPH) representa una de las enfermedades de transmisión sexual más común a nivel mundial. La familia de los VPHs cuenta con más de 150 tipos virales de los cuales 40 son transmitidos sexualmente e infectan órganos tanto del hombre como de la mujer. A lo largo de la historia numerosos estudios han demostrado la importancia de la relación que existe entre la infección por VPH y el desarrollo de cáncer cervicouterino (CaCu) (zur Hausen, 1996; Bosch y de Sanjosé, 2003; Parkin, 2006).

Objetivo. Conocer cuáles son los genotipos del Virus del Papiloma Humano presentes en muestras de citología cervical recibidas en el CICMED y la frecuencia de cada genotipo encontrado en las muestras analizadas en el periodo de enero a abril del 2011.

Material y Método. Se empleó el Kit de Roche *Linear Array HPV Genotyping test*[®] que es una prueba cualitativa para la detección *in vitro* de VPH en células cervicales conservadas en solución PreservCyt[®], el cual se basa en la amplificación del ADN diana de la región L1 polimórfica del genoma del VPH, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación de ácidos nucleicos. El kit es capaz de detectar ADN anogenital de 37 genotipos de VPH (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82 (MM4), 83 (MM7), 84 (MM8), IS39 y CP6108), además permite identificar múltiples genotipos de VPH en la misma muestra.

Resultados. Se procesaron un total de 53 muestras de cepillado cervical, de mujeres tanto del CICMED como del Hospital Materno Perinatal Mónica Pretelini previo consentimiento informado, de las cuales 17 (32.08%) fueron positivas para alguno(s) de los 37 genotipos que detecta el Kit, mientras 36 (67.92%) resultaron negativas. En las muestras se detectaron un total de 18 genotipos: VPH 6, 16, 18, 31, 39, 45, 51, 52, 53, 54, 58, 62, 66, 67, 71, 83, 84, CP6108, siendo el VPH 16 (17.65%) y el VPH 84 (17.65%) los de mayor frecuencia.

Conclusiones. Este estudio permitió conocer los genotipos del Virus del Papiloma Humano presentes en las muestras de citología cervical recibidas en el Laboratorio de Biología Molecular del CICMED y conjuntamente se identificó que los genotipos más frecuentes en las muestras pertenecientes a mujeres mexiquenses fueron el VPH 16 y el VPH 84.

INTRODUCCIÓN

Desde 1948 surgieron las primeras observaciones sobre cuál podría ser la causa del desarrollo del cáncer cervicouterino (CaCu) (zur Hausen, 1977). Sin embargo, fue hasta hace poco más de 30 años cuando se sugirió que la infección producida por el Virus del Papiloma Humano (VPH) era la causal de dicho cáncer, siendo esta la idea que concedería más tarde en 2008 el premio Nobel a Harald zur Hausen (zur Hausen, 2009).

Actualmente se ha establecido que alrededor del 90-95% de los casos de CaCu son atribuibles a la infección por VPH, siendo calificada como la causa necesaria pero no suficiente para el desarrollo de este (Bosch y cols., 2006).

De acuerdo a la Organización Mundial de Salud (OMS) el CaCu es el cuarto cáncer más común en mujeres, con un estimado de 528, 000 nuevos casos en 2012 (World Health Organization IARC, 2017).

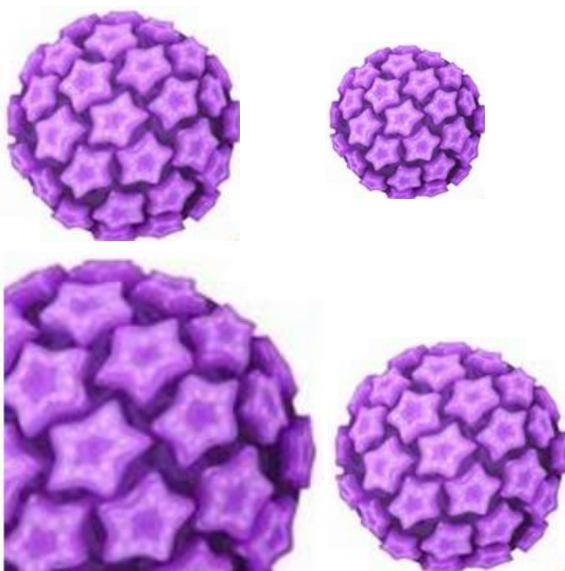
En 2007 el Dr. Aurelio Cruz Valdez, del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) declaró que en México “hay cifras que revelan que 95% de las mujeres menores de 30 años con vida sexual activa ya han tenido una infección por VPH. La mayoría llega a controlarlo con su propio sistema inmune, pero aquellas que no, terminan por desarrollar cáncer temprano” (Instituto Nacional de Salud Pública, 2013).

Actualmente la técnica más utilizada para la detección de CaCu es la citología convencional junto con la tinción de Papanicolaou (Pap) (Pineda y Ceballos, 2008). No obstante, la estrecha relación de causalidad que existe con el VPH ha impulsado el desarrollo de nuevas técnicas que permiten detectar el genoma y/o identificar el tipo viral involucrado (De Guglielmo y Rodríguez, 2010).

Por tanto la prueba de ácido desoxirribonucleico (ADN), mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), constituye un método sensible y poco invasivo para determinar la presencia de una infección cervical activa por VPH, para con ello evaluar la efectividad de las vacunas que actualmente existen; supervisar la persistencia de genotipos específicos asociados con un

riesgo elevado de enfermedades cervicales y carcinogénesis cervical, aparte de facilitar las investigaciones epidemiológicas sobre la infección por VPH (Instituto Nacional de Salud Pública, 2015; Roche Molecular Systems Inc, 2008).

CAPITULO I. MARCO TEÓRICO



1.1 Antecedentes

En tabla 1 se dan a conocer algunos artículos que han sido publicados sobre infección de VPH en mujeres mexicanas principalmente. Se menciona el método empleado, la frecuencia de la infección y los genotipos detectados.

Tabla 1. Estudios sobre frecuencia y genotipos de VPH en México.

Autor/Año	Población	Método de detección de VPH	Incidencia de VPH	Genotipos de VPH identificados
(Ishibashi y cols., 2008)	1160 hombres 362 Mexicanos Cuernavaca, Morelos	<i>Linear Array HPV genotyping test</i> [®] y <i>Nested PCR</i> [®]	61.9% (n=224)	Oncogénicos: VPH 16 (6.5%), 51 (6.5%) y 59 (5.3%) No oncogénico: VPH 84 (7.7%), 62 (7.3%) y 6 (6.6%)
(Capdeville y cols., 2009)	50 mujeres citología normal pero con cambios nucleares	PCR e hibridación reversa en línea. (Reconoce 27 tipos de VPH)	16.0% (n=8)	75% VPH- AR (tipos 58, 35, 18, 56 [n =2] y MM7), 12.5% probable AR (tipo 26) y 12.5 % VPH 11
(Velázquez y cols., 2010)	236 mujeres	PCR	31.3%	VPH 16: 45.9% VPH 18: 31.1% VPH 31: 16.2% VPH 6: 10.8% VPH 11: 6.7%
(López, Medel, Villalba y Sánchez, 2012)	929 mujeres de la Ciudad de México	PCR múltiple HPV4A ACE Screenig. Seeplex [®]	9.1% (n=85)	VPH-AR= 43% VPH 18= 42% VPH 16= 14% Infecciones múltiples: 10%
(Peralta y cols., 2012)	8.706 mujeres	Artículos base de datos PubMed	-	CaCu: VPH 16 (63.1 %), 18 (8.6%), 58 y 31 (5%) HSIL: VPH 16 (28.3%), 58 (12.6%), 18 (7.4%) y 33 (6.5%) LSIL: VPH 16 (13.1%), 33 (7.4%), 18 (4.2%) y 58 (2.6%) Citología Normal: VPH 16 (3.4%), 33 (2.1%), 18 y 58 (1.2%)

Continuación tabla 1.

Autor/Año	Población	Método de detección de VPH	Incidencia de VPH	Genotipos de VPH identificados
(Vázquez, Gómez y Solís, 2015)	102 muestras de mujeres	PCR y micro arreglos <i>LCD-Array, Chiprón®</i>	35.29% (n=36)	VPH-AR: 52 (6,58%); 59 y 45 (5.26%); 16, 31, 56 y 58 (3.95%); 82, 44, 35, 68 y 73 (2.63%); 33, 39, 67, 18, 62, 51, 32 y 34 (1.32%). VPH-BR: 6 (10.53%); 84 (5.26%); 11, 70, y 61 (3.95%); 54, 81 y 42 (1.32%). Otros: 91 (6.58%); 66 (2.63%); 90 y 53 (1.32%) Un genotipo: 38.88% Múltiple: 61.11%
(Aguilar y cols., 2015)	822 mujeres	<i>Linear Array HPV Genotyping test®</i>	12.36% muestras normales 46.03% LIEBG 100.0% LIEAG y CaCu	Más frecuente en todos los grupos: VPH 16 Controles: VPH 62, 51, 84, 18, 53 y Cp6108 LIEBG: VPH 84, 58, 59 y 62 LIEAG: VPH 31, 18, 70, 6, 51, 59, 66 y Cp6108 CaCu: VPH 18, 45, 52, 58 y 39
(Ortega y cols., 2016)	55 muestras de citología cervical	<i>Linear Array HPV Genotyping test®</i>	92.73%	VPH 16= 43.6% Seguido de VPH: 58, 31, 18, y 70 Un genotipo= 38.2% 2 genotipos: 23.6% 3 o más genotipos: 30.9%
(Casillas, Flores, Lozano, Pérez y Llaca, 2017)	316 de Monterrey	Hibridación y PCR	7.0% (n=22)	16, 59, 51, y 42 VPH-AR= 77 % Un genotipo= 59% 2 genotipos= 23 % 3 genotipos= 18 %
(Gallegos, Rivera, Presno y Cervantes, 2017)	1163 mujeres	Captura de híbridos y PCR	36.0%	VPH: 51 (42 %), 52 (38 %), 16 (37%) y 33 (34%) Infección múltiple: 75.37%

1.2 Historia del descubrimiento de la asociación del VPH con el desarrollo del CaCu.

La importancia de las verrugas o papilomas se ha establecido desde la antigüedad reconociendo la etiología de la infección desde el siglo XIX (López y Lizano, 2006). En 1933, Shope estudió y aisló el primer papilomavirus de las verrugas que aparecen en los conejos cola de algodón y posteriormente observaron que al inocular extractos de esas verrugas en conejos domésticos, las lesiones que presentaban manifestaban progresiones malignas en las células del tejido (Peyton y Beard, 1935).

El término *atipia coilocítica* fue acuñado por Koss y Durfee en 1956 para describir los cambios anormales que presentaban las células escamosas de citologías cervicales de pacientes con displasia y carcinoma invasor caracterizadas por grandes vacuolas perinucleares (coilocitos) (De la Fuente, Guzmán, Barboza y González, 2010).

Desde 1972 aparecieron numerosos estudios que trataban de establecer la relación entre el CaCu y la infección por papilomavirus, resultando así la hipótesis del Dr. Harald zur Hausen sobre que el cáncer de cuello uterino podría surgir por infecciones con el mismo virus que se encontraba en condilomas acuminados. Posteriormente, el aislamiento de VPH 6 de papilomas laríngeos y el VPH 11 permitieron dar sustento a esta hipótesis. En 1982 Gissmann y otros publicaron los primeros tres informes sobre la secuenciación de VPH en tumores humanos, encontrando ADN de VPH 6 en biopsias de condiloma acuminado gigante conocido como tumor de Buschke-Löwenstein (zur Hausen, 2009).

El aislamiento de VPH 16 y VPH 18 junto con la recurrencia con la que eran encontrados estos en las biopsias de CaCu hizo evidente que estos virus desempeñaban un papel importante en el desarrollo del CaCu. Por estos descubrimientos y posteriores estudios que condujeron a una mejor comprensión del mecanismo de carcinogénesis mediada por VPH y el desarrollo de una vacuna preventiva, fueron las principales razones por las que se le concedió al Dr. Harald zur Hausen la mitad del Premio Nobel en el 2008 (Nobelprize.org, 2016).

1.3 Generalidades del VPH

1.3.1 Taxonomía

Los papilomavirus corresponden a la familia *Papillomaviridae* y el VPH pertenece a cinco de los 16 géneros de esa familia: *alfa*, *beta*, *gamma*, *mu* y *un* (figura 1) (de Villiers, Fauquet, Broker, Bernard y zur Hausen, 2004).

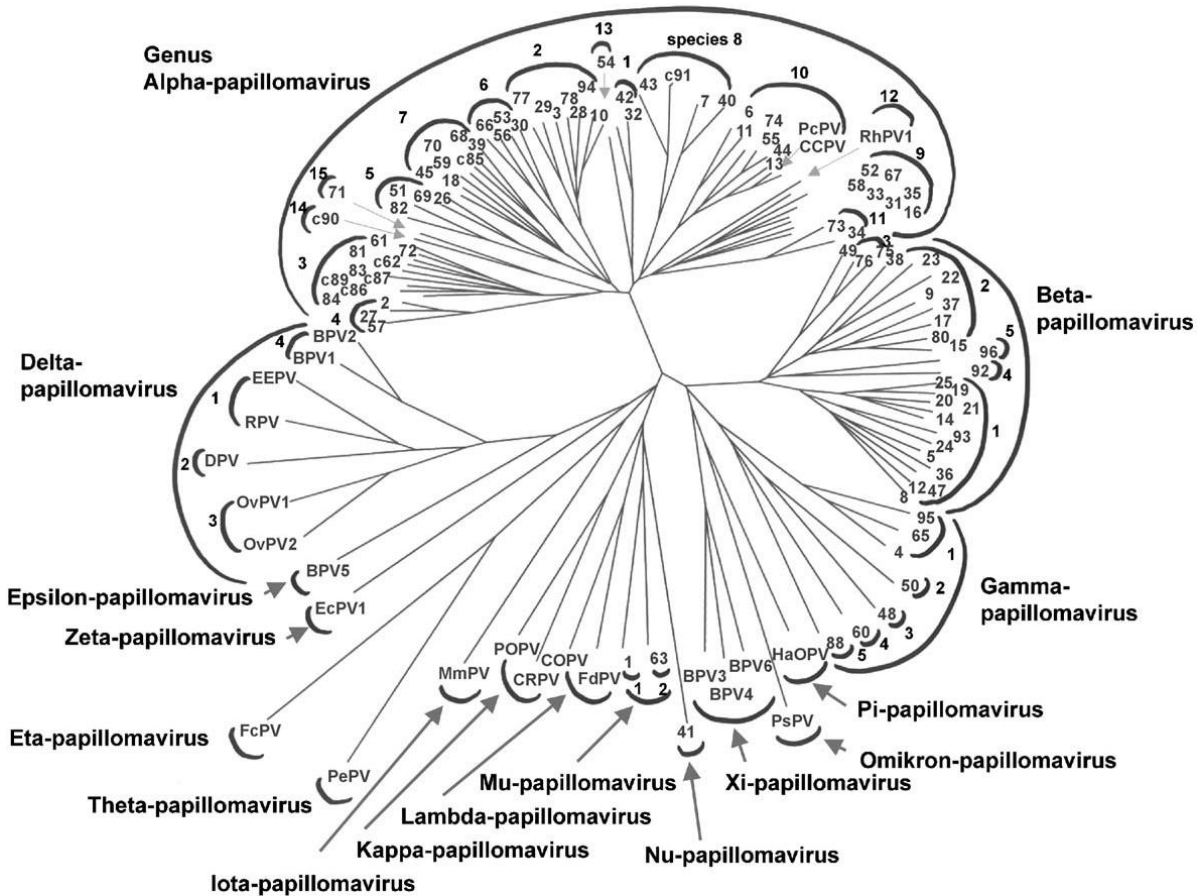


Figura 1. Árbol filogenético con 118 tipos de VPH.
Fuentes: de Villiers y cols., 2004.

1.3.2 Características del VPH

Los papilomavirus presentan un alto tropismo por las células epiteliales de la piel y mucosas, sus principales características se describen tabla 2 (Brooks, Carroll, Butel, Morse y Mietzner, 2011).

Tabla 2. Características y funciones de las estructuras del VPH.

Estructura	Función
Virión	Cápside Icosaédrica de 55 nanómetros (nm) de diámetro y 72 capsómeros (figura 2).
Composición	ADN (10%) y Proteínas (90%).
Genoma	ADN bicatenario, circular de 8 Kpb.
Proteínas estructurales	La proteína mayor L1 (peso molecular de 55 KDa) y la proteína menor L2 (peso molecular de aproximadamente de 75 KDa).
Cubierta	No tienen.
Núcleo	Sitio de replicación.

Fuente: Modificado de Brooks y cols., 2011.

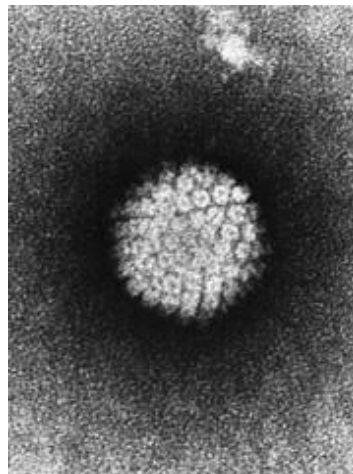


Figura 2. Microfotografía electrónica del VPH con tinción negativa.

Fuente: Laboratory of Tumor Virus Biology - NIH-Visuals Online# AV-8610-3067.

1.3.3 Clasificación de genotipos del VPH

De los más de 100 tipos de VPH identificados 40 infectan el tracto anogenital y alrededor de 30 se asocian con el desarrollo de CaCu. No existe una clasificación definida totalmente. Sin embargo, pueden considerarse a 19 genotipos de VPH como de “alto riesgo” para el desarrollo de CaCu, a 17 como de “bajo riesgo” y a 1 de “riesgo no determinado” (tabla 3) (Muñoz y cols., 2003).

Tabla 3. Clasificación de genotipos de VPH con base en su nivel de riesgo oncogénico.

Clasificación	Genotipos de VPH
Alto riesgo	16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 73, 82
Bajo riesgo	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 57, 61, 62, 70, 71, 72, 81, 83, 84, CP6108
Riesgo no determinado	34

Fuente: Muñoz y cols., 2003.

Actualmente existe otra clasificación que hace una división en tipos y subtipos de VPH basándose en la comparación de la secuencia de ADN de E6, E7 y L1 con la misma de todos los VPH conocidos. Una homología inferior al 90% supone un nuevo tipo, mientras que una superior al 90%, un subtipo del tipo anteriormente descrito (de Villiers y cols., 2004).

1.3.4 Estructura del genoma del VPH

El genoma de los VPH se puede dividir en tres zonas (figura 3): la región larga de control (LCR), la región temprana (E = *early*), y la región tardía (L = *late*) (Samorski, Gissmann y Osen, 2006).

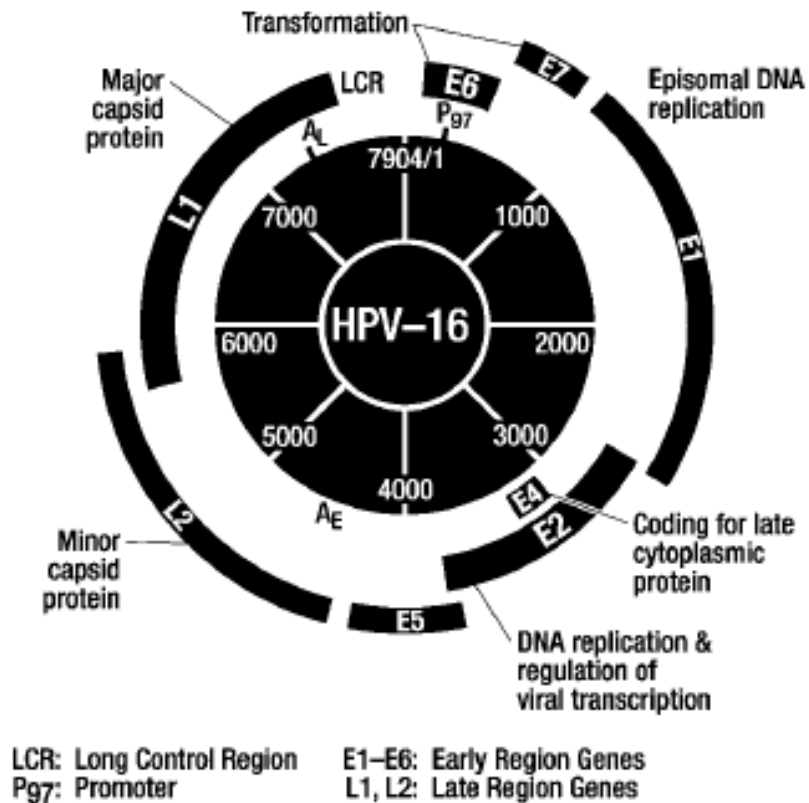


Figura 3. Mapa genético del VPH 16.
Fuente: Hubbard, 2003.

1.3.4.1 Región Larga de Control (LCR)

Se conoce también como unidad reguladora no codificante (URR) (figura 4) ya que como el nombre lo indica no codifica para ninguna proteína; representa entre el 7 y 11 % del tamaño total del genoma dependiendo del virus, contiene aproximadamente 850 pares de bases (pb) en los VPH genitales, sus principales funciones son: regular la expresión genética (tanto de la región temprana como de la región tardía, principalmente de los genes E6 y E7), la replicación del ADN y potencia la transcripción de promotores de síntesis del ARN (Graham, 2010).

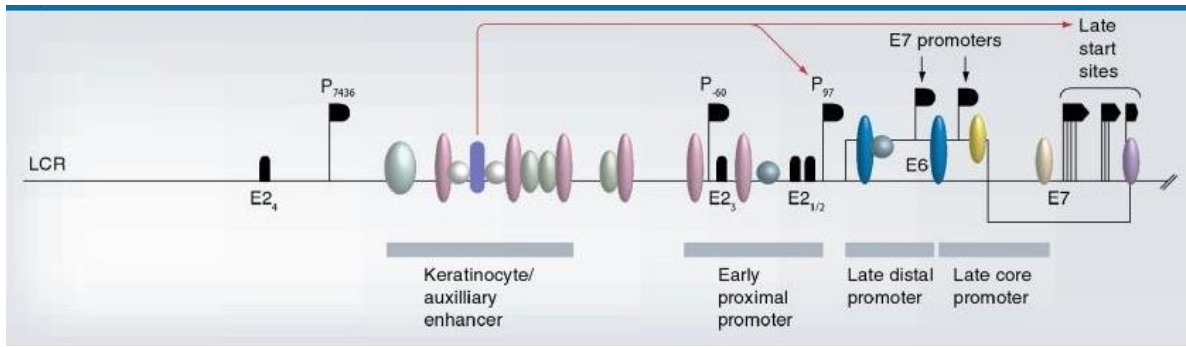


Figura 4. Mapa Genético de la Región Larga de Control de los VPH.
Fuente: Graham, 2010.

1.3.4.2 Región temprana

Se encuentra formada por seis genes (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) que producen proteínas no estructurales generadas a partir de un promotor temprano (P_E). Estas proteínas desempeñan un papel importante en la replicación y la transcripción viral (tabla 4); en la modificación estructural de las células infectadas, su señalización, su ciclo y en el control de la apoptosis. Además modula la respuesta inmune (Ruíz, 2003; Graham, 2010).

1.3.4.3 Región Tardía

Está formada por los genes L1 y L2 que son las proteínas estructurales de la cápside viral necesaria para la transmisión, la propagación y la supervivencia del virus. Se expresan en las células diferenciadas del epitelio (en la capa granular) a partir de un promotor tardío (P_L) en fases finales de la infección (tabla 4) (Graham, 2010; Mascareñas, Ortiz de la Peña, Cruz y Sams, 2007).

Tabla 4. Funciones de los genes del VPH.

Genes	Funciones
E1	Modulador de la replicación de ADN, mantenimiento del plásmido, represión de la replicación
E2	Regulación de la transcripción viral, represión de E6 y E7, uniones con LCR
E3	Desconocida
E4	Disrupción de la citoqueratina en células escamosas, detención del ciclo celular, ensamble del virión
E5	Control del crecimiento, detención del ciclo celular y modulación inmunológica
E6	Oncoproteína, inhibe la apoptosis, regula la proliferación y transformación celular, ligada a p53
E7	Proliferación y transformación celular, activación de la transcripción, ligada a gen Rb
L1	Mantenimiento de la proteína mayor de la cápside
L2	Proteína menor de la cápside

Fuente: De la Fuente y cols., 2010; Graham, 2010.

1.3.4.4 Gen L1

Dentro de esta región se regula la transcripción de los genes E6 y E7. Tiene un peso molecular de 55 Kilodalton (KDa), se encuentra presente en el 80% de la composición de la cápside. Presenta variaciones en el tamaño y composición de nucleótidos en los diferentes tipos de VPH pero en general es un fragmento altamente conservado a diferencia de la L2, que presenta más variaciones. Este hecho junto con la una reactividad cruzada entre los genotipos de VPH hace que se tenga un interés estratégico en este gen, para el desarrollo de técnicas de diagnóstico y en la investigación de modelos de vacunas (López y Lizano, 2006; Vilata, 2001).

1.4 Ciclo Viral

La transmisión de VPH epiteliales es por contacto directo de persona a persona con áreas infectadas de la piel. Los VPH genitales se transmiten por contacto sexual. No obstante, se han sugerido otras vías de contagio como los fómites. Sin embargo, no parecen ser significativas (American Cancer Society Inc, 2014).

La infección comienza con la adhesión de viriones a células basales o germinales a través de una abertura en el epitelio estratificado, a partir de lo cual pueden presentarse dos tipos de infecciones: latente o productiva (figura 5) (Doorbar, 2005).

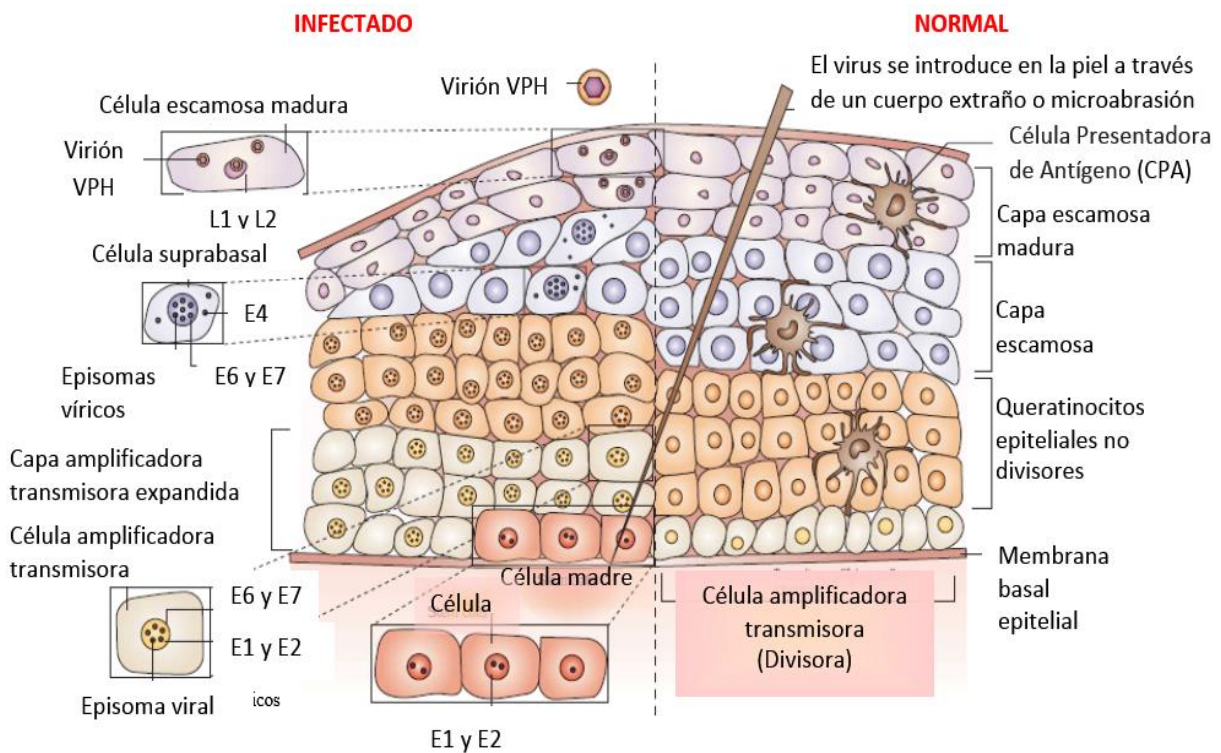


Figura 5. Ciclo viral del VPH en el epitelio estratificado.

Fuente: Modificada de Frazer, 2004.

1.4.1 Infecciones productivas o activas

La producción de viriones no ocurre hasta la capa exterior del epitelio. No obstante, está ligada a la replicación viral y al proceso de queratinización y diferenciación celular. Existe controversia

sobre cuál es el receptor que permite la unión del virus a la célula pero se ha sugerido el complejo integrina $\alpha 6 - \beta 4$ como el receptor de membrana. Además de que se alude que la entrada depende de la presencia de proteoglicanos de sulfato de heparina en la membrana plasmática, los cuales podrían ser el primer lugar de unión y posteriormente la unión con el receptor. La introducción del virus ocurre por endocitosis de vesículas cubiertas de clatrina. El ambiente reductor de las células basales puede propiciar el rompimiento de los enlaces disulfuro internos de la cápside lo que provocaría el desensamble del virión y permitiría el transporte del ADN viral al núcleo, donde se cree que para mantener el genoma como un episoma se expresan las proteínas E1 y E2 que además facilitan la correcta segregación los genomas durante la división celular, esta infección inicial continua con un fase proliferación, en la cual se expresan las proteínas E7 y E6 que evitan que las células basales terminen su ciclo de diferenciación, una vez que emigran al estrato suprabasal del epitelio y promueven la proliferación mediante interacciones con proteínas celulares responsables del control del ciclo celular, estimulando el progreso de la fase del ciclo celular de G1 a S. El virus amplifica y empaqueta su genoma para producir viriones infecciosos en las capas intermedias o superiores del epitelio, donde aumenta la actividad del promotor tardío, que se encuentra en el marco abierto de lectura de E7 y promueve la expresión de proteínas involucradas en la replicación del ADN viral (E1, E2, E4 y E5) y de las que constituyen la cápside (L1 y L2). Se requiere que E2 se una a LCR y promueva la unión de E1 en sitios donde se de origen a la replicación viral. Las partículas virales son ensambladas en el estrato granuloso del epitelio y es en la capa superior de este, donde las células infectadas se descaman pero permanecen en el ambiente antes de que el virus sea transmitido a una nueva superficie epitelial. El virus al ser resistente a la desecación se establece extracelularmente y puede ser transmitido. Se ha sugerido que la proteína E4 rompe los complejos de citoqueratina contribuyendo así a la salida del virus de las capas superiores del epitelio ya que el VPH no es lítico (López y Lizano, 2006; Doorbar, 2005).

Algunos tipos de VPH provocan que el genoma viral se amplifique en células escamosas superficiales y produce miles de copias por célula, lo cual puede provocar la activación de los genes tardíos L1 y L2 que producen la proteína de la cápside, dando lugar a viriones que al

acumularse en las células provocan la aparición de características anormales como lo son: la presencia de un halo claro perinuclear y un núcleo irregular agrandado e hipercromático que frecuentemente presenta fenómenos de binucleación (Frazer, 2004).

1.4.2 Remisión de la infección

La regresión de las lesiones provocadas por el VPH se lleva a cabo en aproximadamente 16 semanas y se asocia a la infiltración celular de linfocitos T (Doorbar, 2005).

1.4.3 Infección latente

En el núcleo de las células basales el ADN del virus se encuentra en forma episomal (forma circular libre) y se replica por vía extracromosomal sugiriendo como causa la expresión de los genes E1 y E2, mientras que la expresión de los genes E6 y E7 durante esta fase del ciclo de vida del virus no es necesaria. En este estado no hay cambios morfológicos que se puedan identificar, por lo que la detección viral en este tipo de infecciones sólo puede hacerse por métodos moleculares (Doorbar, 2005; De la Fuente y cols., 2010).

1.5 Aspectos clínicos

La verruga o papiloma es la manifestación morfológica más común de la infección por VPH. En la piel pueden ser verrugas planas (superficiales) o verrugas plantares (más profundas). Las verrugas genitales, o condilomas son causadas por los genotipos 6 y 11 en un 90 % de los casos (López y Lizano, 2006). Tanto los VPHs oncogénicos como los no oncogénicos, pueden causar lesiones intraepiteliales, las cuales en la mayoría de los casos se revierten espontáneamente (figura 6). Sin embargo, la prevalencia de la infección y la respuesta inmune determinan la progresión de las lesiones (Frazer, 2004).

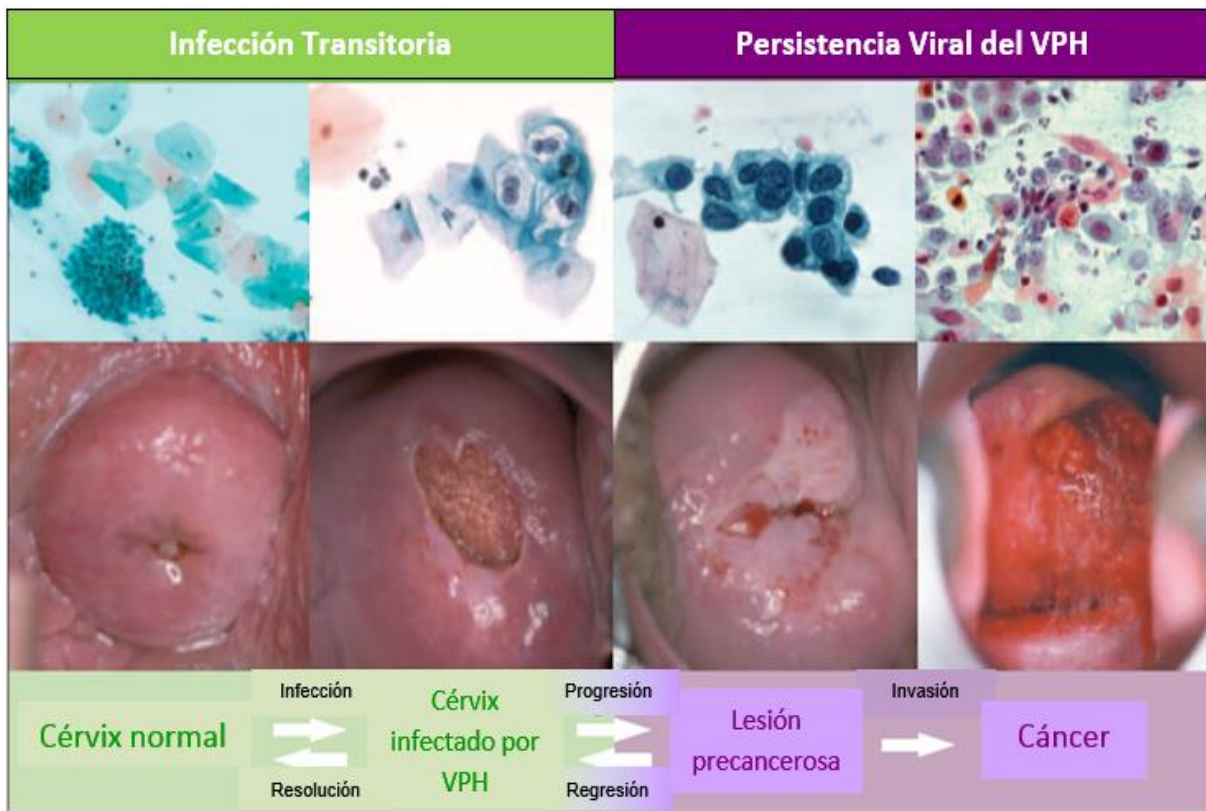


Figura 6. Desarrollo de Cáncer Cervicouterino.
Fuente: Modificada de Schiffman y cols., 2007.

Existen diversos sistemas que son empleados para clasificar las lesiones precancerosas del cérvix. Los principales sistemas se resumen en la tabla 5 (Alameda y Carreras, 2007).

Tabla 5. Equivalencia de los principales sistemas de clasificación de las lesiones precancerosas del cérvix.

Clasificación	Nomenclaturas				
Papanicolaou	Case I (Normal)	Clase II	Clase III	Clase IV	Clase V
Displacías	Normal	Leve	Moderada	Grave	Carcinoma “ <i>in situ</i> ”
NIC (Richard)	Normal	NIC 1	NIC 2	NIC 3	
Bethesda	Normal	SIL de bajo grado (LSIL)	SIL de alto grado (HSIL)		

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical
 SIL: Lesión Intraepitelial Escamosa
 Fuente: Alameda y Carreras, 2007

1.6 Oncogénesis

La integración del ADN del VPH al ADN de la células del hospedero juega una papel fundamental en la progresión de la lesiones. Se ha visto que al menos en el VPH 16 la integración del ADN ocurre frecuentemente cerca de la región E1/E2 donde provoca una ruptura que lleva a la perdida de las regiones E1 y E2. La disrupción de E2 libera promotores virales que aumentan la expresión de los oncogenes E6 y E7, debido a que un producto de E2 reprime la transcripción de las regiones de E6 y E7. Las proteínas víricas E6 y E7 degradan selectivamente los productos del gen p53 y del gen del retinoblastoma (Rb). Este hecho es considerado como una parte fundamental en la trasformación maligna de las células del hospedero, en el desarrollo y formación tumoral como se muestra en la figura 7 (Bosch, Lorincz, Muñoz, Meijer y Shah, 2002).

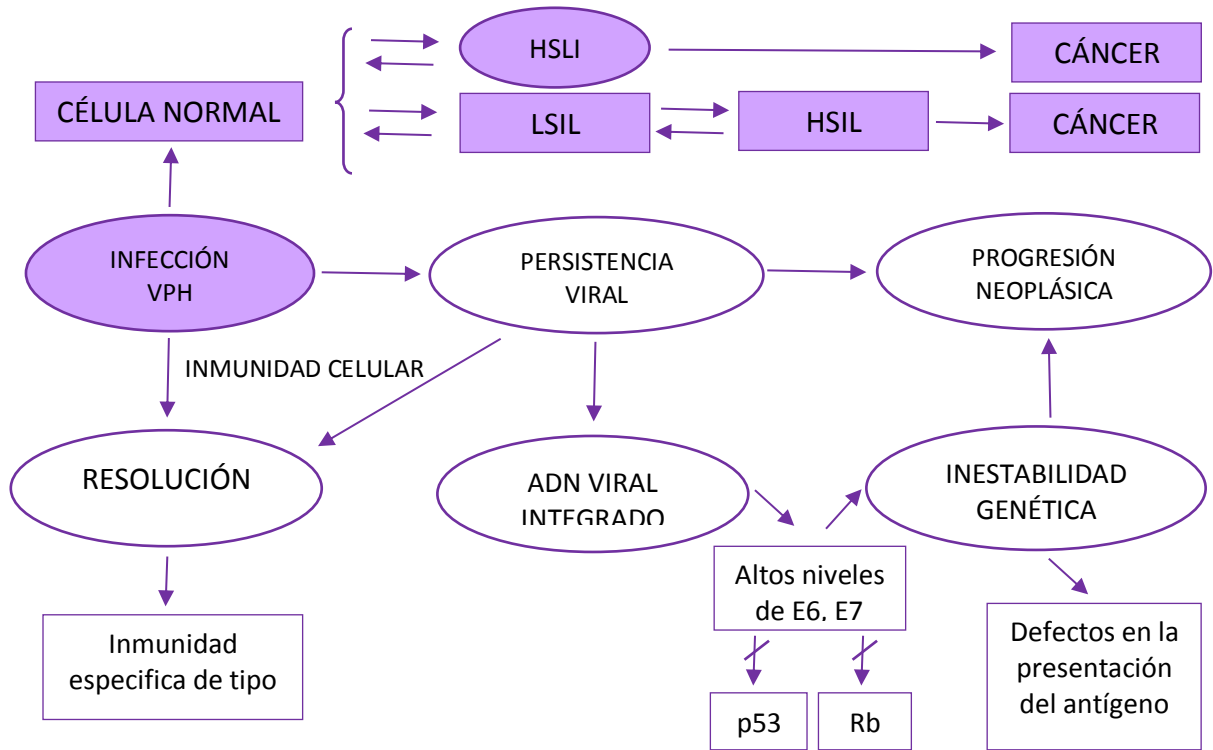


Figura 7. Mecanismo teórico de carcinogénesis cervical por infección de VPH.
Fuente: Modificado de Bosch y cols., 2002.

1.7 Factores de riesgo

El primer requisito para el desarrollo de CaCu, es la infección persistente por VPH oncogénicos, aunque se han descrito otros factores que contribuyen con la progresión de las lesiones. De entre los cuales se mencionan, el inicio de actividad sexual a temprana edad, el número de parejas sexuales, multiparidad vaginal, nivel socioeconómico, pareja sexual con cáncer de pene, la carga viral (CV) y la variación intratipo del VPH (López y Lizano, 2006). Además de otros factores como (Bosch y cols., 2006):

Deficiencias inmunes adquiridas (infección por VIH, tratamientos inmunosupresores) o congénitas (respuestas inmunológicas anormales, polimorfismos en p53, entre otros)

Factores hormonales endógenos (hormonas esteroideas) o exógenos (anticoncepción oral): La LCR contiene elementos de respuesta a glucocorticoides, los cuales son inducidos por

hormonas esteroideas como la progesterona (componente activo de los anticonceptivos orales) y la dexametasona.

Infección por otras enfermedades de transmisión sexual: Particularmente por *Chlamydia Trachomatis* o por el virus de herpes simple tipo 2.

Hábitos alimenticios y consumo de tabaco.

Los factores principalmente descritos en la literatura que han sido asociados a la infección por VPH en mujeres son:

Edad: Se ha encontrado que la prevalencia de la infección es más alta en mujeres menores de 25 años y en mujeres que comienzan a tener relaciones sexuales a temprana edad. También se ha encontrado en mujeres adolescentes que el aumento promedio de más de 1.5 años de edad del compañero sexual con respecto a la edad de la mujer (Oviedo y cols, 2004; Baseman y Koutsky, 2005).

Número de parejas sexuales: Es el factor más consistente para la infección ya que se ha demostrado una fuerte asociación entre el número de parejas sexuales y la adquisición de VPH genital (a mayor número de parejas tanto de la persona como del compañero sexual mayor exposición y riesgo) (Baseman y Koutsky, 2005).

Consumo de tabaco: Diversos estudios han mostrado algún grado de asociación entre el consumo de tabaco y la infección (Xi y cols., 2009).

1.8 Frecuencia de infección por VPH a nivel mundial y en México

En 2007 fue publicado un metaanálisis que recuperó los informes de prevalencia de VPH publicados entre enero de 1995 y enero de 2005, en mujeres con citología cervical normal de todo el mundo, abarcando una población de 157 879 mujeres, estimando un 10.4 % de prevalencia de VPH positivo. En África, la estimación fue de 22.1%, América Central y México 20.4 %, América del Norte 11.3 %, Europa 8.1 % y en Asia 8.0 %. Para las regiones de América se estima que la mayor prevalencia corresponde a América Central (Costa Rica, Honduras y

México) con un 20.4 %, seguido de América del Sur (Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Paraguay y Perú) con 12.3 % y por último América del Norte (Canadá, Estados Unidos y Groenlandia) con 11.3 %. Los cinco genotipos de VPH más comunes a nivel mundial fueron VPH 16 (2.5%), VPH 18 (0.9%), VPH 31 (0.7%), VPH 58 (0.6%) y VPH 52 (0.6%). Para América Central los genotipos más comunes fueron el VPH 16 (4.0%), VPH 31 (1.9%), VPH 18 (1.8%), VPH 53 (1.5%) y el VPH 58 (1.2%). La tasa de prevalencia fue mayor en países en vías de desarrollo (15.5%) que en países desarrollados (10.0%). Según los datos arrojados por este estudio se estimó que alrededor de 291 millones de mujeres han sido portadoras de VPH en algún momento de su vida y que 23% de estas infecciones corresponden al VPH 16 y 8.5% al VPH 18 a nivel mundial (de Sanjosé y cols., 2007).

En 2010 se publicó otro metaanálisis mundial que incluyó estudios publicados entre enero de 1995 y mayo de 2009, los cuales utilizaban la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o Hybrid Capture 2 (HC2) para la detección de VPH. Se evaluaron a un total de 1 016 719 mujeres, la prevalencia mundial estimada fue de 11.7% en mujeres infectadas por VPH pero sin hallazgos citológicos anormales. Las regiones con mayor prevalencia fueron: Regiones subsaharianas de África (24,0%), América Latina y el Caribe (16,1%), Europa del Este (14,2%) y el sureste de Asia (14,0%). Los tipos más comunes de VPH encontrados fueron VPH 16(3.2%), VPH 18(1.4%), VPH 52(0.9%), VPH 31(0.8%), y VPH 58 (0.7%). También se mencionó que aproximadamente el 3.2 % de las mujeres estudiadas tuvieron infección por múltiples genotipos de VPH (lo que corresponde 20.0 % de mujeres positivas a VPH), de acuerdo a lo reportado por el Centro de información sobre el VPH y el cáncer (Bruni y cols., 2010).

El centro de información sobre VPH y cáncer reporta que en México la prevalencia de VPH en mujeres con citología normal es de 10.5% y los genotipos de alto riesgo son: VPH 16 (3.2%), VPH 18 (1.9%), VPH 33 (1.8%), VPH 58 (1.3%), VPH 59 (1.0%), VPH 31 (0.9%), VPH 45 (0.7%), VPH 51 (0.7%), VPH 52 (0.6%), VPH 35 (0.4%), VPH 56 (0.4%) y VPH 39 (0.3%). Los de probable alto riesgo: VPH 70 (1.2%), VPH 53 (0.9%), VPH 66 (0.4%), VPH 68 (0.4%), VPH 85 (0.4%), VPH 97 (0.4%), VPH 26 (0.1%), VPH 34 (0.1%), VPH 67 (0.1%), VPH 69 (0.1%), VPH 73 (0.1%), VPH 82 (0.1%) y los no oncogénicos: VPH 6 (0.9%), VPH 61 (0.7%), VPH 62 (0.7%), VPH 81 (0.6%), VPH

11 (0.5%), VPH 42 (0.5%), VPH 44 (0.4%), VPH 71 (0.4%), VPH 84 (0.4%), VPH 90 (0.4%), VPH 83 (0.3%), VPH 43 (0.2%), VPH 54 (0.2%), VPH 87 (0.2%), VPH 89 (0.2%), VPH 32 (0.1%), VPH 40 (0.1%), VPH 57 (0.1%), VPH 72 (0.1%) y VPH 74 (1,632 casos) (Information Centre on HPV and Cancer ICO/IARC, 2017).

Para conocer el comportamiento del VPH en México se realizó un análisis estadístico que comprendió 10 años de 2003 – 2013. La información para el estudio fue obtenida del Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE) en donde se reportó que de un total de 270 917 casos de infección por VPH, 259 952 corresponden a mujeres (96.0%) y se observó un claro incremento en la incidencia de mujeres infectadas en dicho periodo (tabla 6 y figura 8) (Secretaría de Salud, Desarrollo, Evolución y Estadística del Virus del Papiloma Humano, 2014).

Tabla 6. Casos por año de infección por VPH en población femenina (2003-2013).

Año	Casos	Incidencia
2003	18 142	34.64
2004	20 554	38.81
2005	24 008	44.86
2006	23 212	42.92
2007	20 526	38.21
2008	22 365	41.25
2009	27 400	50.09
2010	30 249	54.83
2011	34 885	62.71
2012	38 611	64.55
Total	259 942	-

Fuente: Modificado de Secretaría de Salud, 2014.

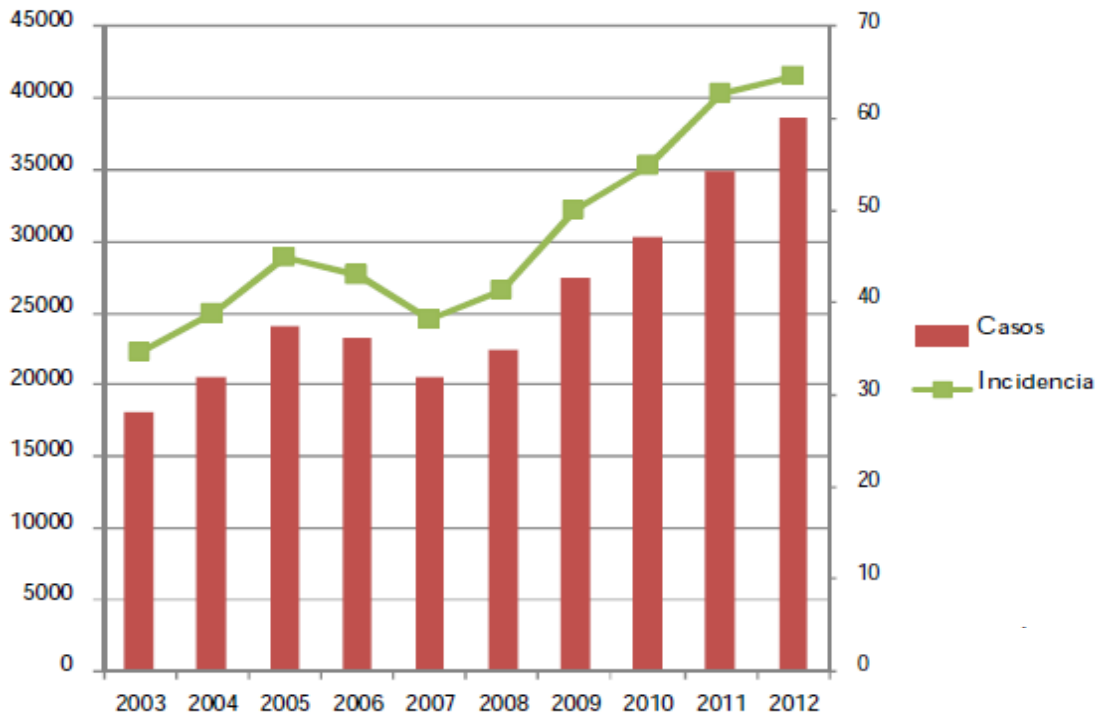


Figura 8. Casos por año de infección por VPH en población femenina (2003-2013).
Fuente: Modificado de Secretaría de Salud, 2014.

1.9 Métodos de Diagnostico

1.9.1 Métodos morfológicos

Citología Cervical Convencional: Método de tamizaje de elección que junto con la tinción de Papanicolaou (Pap) se utiliza para la detección temprana del cáncer cérvico uterino y otras alteraciones celulares como los coilocitos, que son indicativos de infección por VPH. Consiste en una serie de procesos para la obtención mediante un raspado o cepillado, extendido, conservación, tinción y observación de células que se descaman del epitelio que reviste el cérvix, para detectar anomalías morfológicas de la células epiteliales u otras anomalías malignas. La fortaleza del método se basa en las décadas de experiencia de uso, en su alta eficacia y bajo costo, aunque dentro de sus principales limitaciones se encuentra la frecuencia de falsos negativos que puede ascender hasta 54% debido principalmente a la toma y análisis de las muestras (Varela, 2005; Espinosa, Arreola, Velázquez, y Rodríguez, 2014).

Citología de base líquida: Esta técnica fue desarrollada con el propósito de reducir los falsos negativos y mejorar la prueba citológica convencional, en este método las células son dispensadas y conservadas en una solución fijadora y a través de filtros las células son disgregadas y el moco es disuelto lo que ofrece ventajas sobre la citología convencional al eliminar materiales que pueden afectar la evaluación de las células epiteliales como sangre, moco, células inflamatorias y otros artefactos, para posteriormente depositarlas en una capa celular (monocapa) mejorando y facilitando con todo esto la observación y la lectura microscópica celular (Varela, 2005). Otras ventajas que incluye son menor probabilidad de repetición y la capacidad de usar la misma prueba para la detección de VPH. Sin embargo, su costo es mayor que la citología convencional (American Cancer Society Inc, 2014).

Colposcopia: Procedimiento que se realiza después de un resultado positivo en la citología convencional. Consiste en la visualización magnificada (mediante el uso del colposcopio) del cuello uterino y áreas adyacentes después de la aplicación de ácido acético al 5% y solución de lugol. Brinda información sobre la estructura del epitelio y clasifica las imágenes obtenidas en: anormal si presenta alteraciones mínimas (cambios menores o grado 1), graves (cambios mayores o grado 2) o muy graves (sugestivas de carcinoma) conforme a las características establecidas en la clasificación internacional de la *International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy* (IFCPC) (Tinnirello, 2008).

La citología convencional junto con la colposcopia y la histología (por medio de una biopsia) son la base del protocolo en México para la prevención secundaria, detección y diagnóstico de las lesiones intraepiteliales e invasoras del cérvix de acuerdo a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994 (Secretaría de Salud, 2007).

1.9.2 Métodos inmunohistoquímicos

Determinación de p16INK4a: La unión de la proteína E7 del VPH con la proteína supresora de tumor de retinoblastoma (pRb) provoca que pRb se inactive quedando eliminado su efecto regulador sobre la proteína p16 lo que resulta en la sobreexpresión y acumulación de p16INK4a en las células. Su detección se realiza por inmunohistoquímica en muestras de

citología cervical y en biopsias cervicales incluidas en parafina, la desventaja es que p16INK4a también se sobre expresa en otros tipos de cáncer y en lesiones cervicales no asociadas a VPH (Gutiérrez, de la Fuente y Astudillo, 2014).

Antígeno Ki67: Proteína nuclear que se identifica en células en proliferación y que se expresa en todas las fases del ciclo celular, establece la ausencia o presencia de lesiones intraepiteliales, su grado y extensión de células positivas, por lo cual puede utilizarse para detectar lesiones NIC II y NIC III asociadas a infección por VPH. No obstante es un marcador poco específico ya que aumenta en cuadros de inflamación (Gutiérrez, de la Fuente y Astudillo, 2014; Torres, Alameda, Ordi y Costa, 2012).

1.9.3 Métodos moleculares

Dada la importancia que tiene la infección por VPH en el desarrollo de CaCu se han desarrollado técnicas moleculares que facilitan su detección con mayor precisión, sensibilidad y especificidad, demostrando que son útiles para la disminución tanto de la mortalidad como de la morbilidad por CaCu. En la figura 9 se muestra la clasificación de algunas pruebas moleculares empleadas.

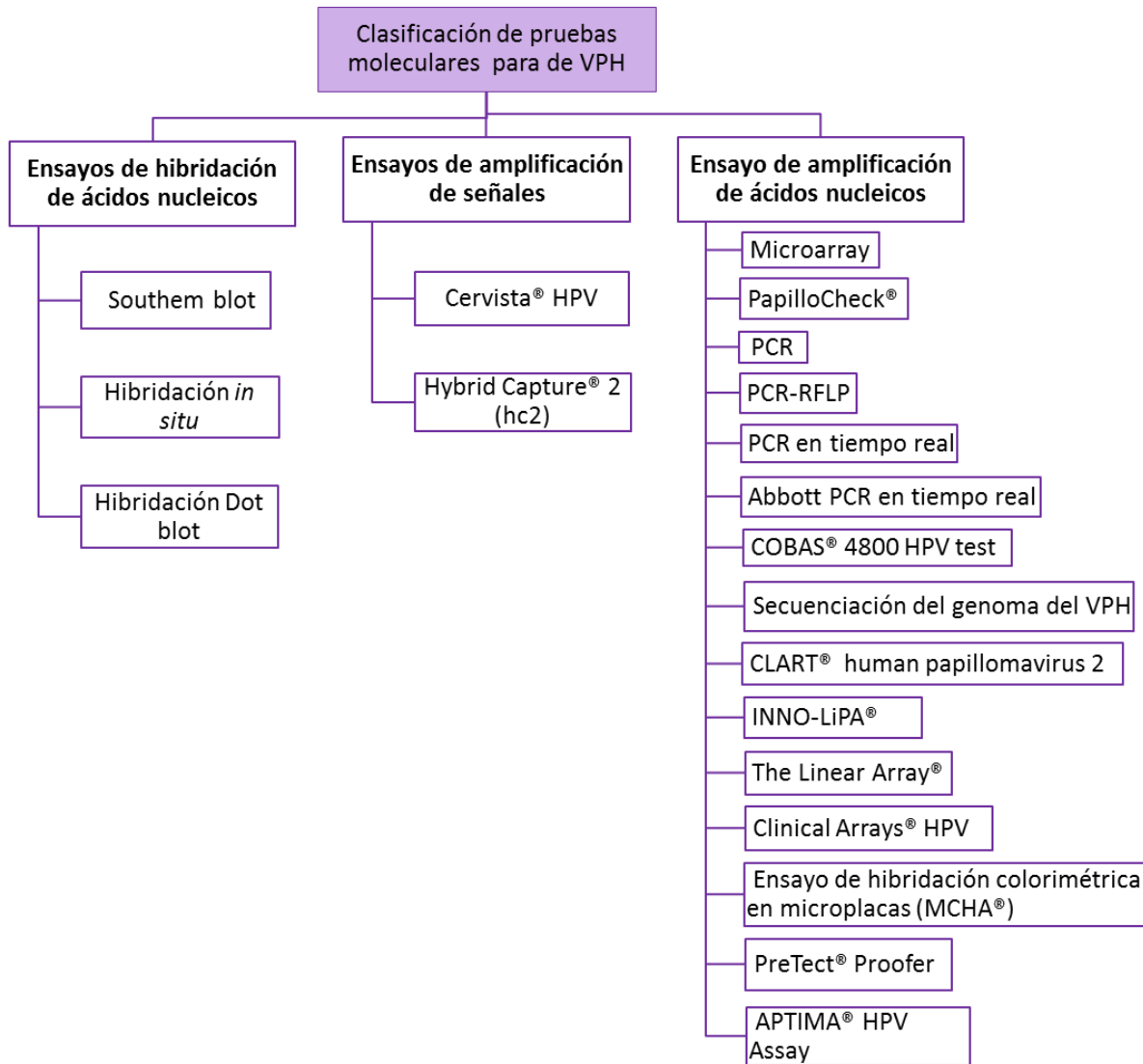


Figura 9. Diagrama de clasificación de pruebas moleculares para detección de VPH.
Fuente: Modificado de Abreu, 2012.

Captura de híbridos de segunda generación (CH2): Es un método aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos de América. Se basa en la hibridación de sondas de ARN con ADN del VPH. Los híbridos son capturados y reaccionan con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina que están en la fase sólida. El producto luminiscente (que resulta de la adición de un sustrato quimioluminiscente) es detectado por un luminómetro y expresado en unidades relativas de luz (RLU) proporcionales a la cantidad de ADN del VPH

presentes en la muestra biológica, lo que aporta una estimación de la carga viral. Este método detecta si la infección es producida por VPH de alto riesgo (13 tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) o por VPH de bajo riesgo (5 tipos: 6, 11, 42, 43, 44) sin dar a conocer el genotipo específico que la produce; Su sensibilidad es de 1 picogramo (pg) por mililitro (ml) de muestra equivalente a 5 000 copias de ADN de VPH (inferior a la de la PCR) además de que se han descrito hibridaciones cruzadas entre los dos tipos de sondas empleadas (alto riesgo y bajo riesgo) y con los genotipos 6, 11, 26, 40, 42, 53, 54, 61, 66, 70, 73, 81, MM4, IS39, CP6108 (QIAGEN, 2017; Ortiz, Torres y García, 2006).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Es la técnica de amplificación de secuencia diana más utilizada, es altamente sensible y específica, lo que se debe principalmente a los cebadores empleados por ejemplo: PGMY09/PGMY11 y GP5+/GP6+ que son dirigidos a la región más conservada del VPH (gen L1 de la cápside). En la actualidad se han diseñado diferentes tipos de PCR para detección y genotipificación del VPH que incluyen las específicas de tipo (utilizan cebadores diseñados para detectar un determinado tipo de VPH), los sistemas denominados de amplio espectro (utilizan cebadores diseñados en su mayoría para la región L1 e identifica infecciones múltiples) y las de tiempo real (además del diagnóstico y genotipificación es utilizada para la determinación cualitativa de la carga viral) entre otras, además de que tanto las específicas de tipo como las de amplio espectro han sido adaptadas a las de tiempo real (Abreu, 2012; Ortiz y cols., 2006).

Linear Array: En la actualidad es uno de los sistemas más sensibles y específicos para determinar una infección latente, subclínica y activa por VPH. Se basa en cuatro procesos principalmente: Preparación de las muestras, que consiste en la liberación del ADN del VPH de las células cervicales por acción de la lisis producida ante la presencia de la proteinasa K, posteriormente se aísla y purifica el ADN en una columna y se lleva a cabo la elución; en el uso de la PCR en la que se emplean cebadores biotinilados (PGMY09/PGMY11) para amplificar una secuencia de nucleótidos de la región L1 con una longitud de aproximadamente 450 pares de bases (pb) y un par de cebadores adicionales para coamplificar el gen de la β -globina humana de 268 pb como control para asegurar la adecuación de las células, la extracción de ADN y la

amplificación; en la aplicación de la hibridación reversa en tira (soporte sólido de nitrocelulosa que contiene inmovilizadas múltiples sondas específicas de tipo); y en la detección de los productos mediante una reacción colorimétrica e interpretados por medio de una guía de referencia. Este ensayo permite detectar 37 genotipos de VPH, incluyendo 15 de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82), 3 de probable alto riesgo (26, 53 y 66), 10 de bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108) y 9 genotipos de riesgo indeterminado (55, 62, 64, 67, 69, 71, 83, 84 y IS39) (Roche Molecular Systems Inc, 2017).

La principal ventaja que tiene este método a nivel clínico es que permite determinar el genotipo específico que causa la infección, lo cual es muy importante tanto para el caso de los genotipos de bajo riesgo, ya que aunque no implican riesgo de cáncer pueden causar anormalidades citológicas; como para los de alto riesgo ya que puede ser un predictor del desarrollo de lesiones de alto grado y se pueden optimizar las estrategias de tratamiento para las pacientes. Así como la importancia de la detección de las infecciones producidas por múltiples genotipos de VPH, que no obstante que en la literatura se reportan resultados contradictorios, podría estar relacionada con el grado de desarrollo de la lesión y la tolerancia inmunológica que ocasiona la persistencia de la infección (Baseman y Koutsky, 2005; Carozzi y cols., 2012).

La prueba cuenta con una sensibilidad del 96%, una especificidad del 99% y una reproducibilidad de 99%. Sin embargo, se pueden obtener resultados erróneos para el VPH 52 ya que contiene una sonda de reacción cruzada que hibrida con los genotipos 33, 35, 52 y 58 que no descartan la coinfección con el genotipo 52 del VPH (Roche Molecular Systems Inc, 2017).

Como se mencionó anteriormente existen diferentes pruebas moleculares de detección de VPH a continuación se muestra los métodos más utilizados y los genotipos que cada uno es capaz de detectar (tabla 7).

Tabla 7. Genotipos de VPH detectados por diferentes sistemas moleculares.

Tipos del VPH	HC2 HPV DNA assay [®]	MY09/11 Dot Blot [®]	PGMY09/11 Reverse LBA [®]	GP5+/GP6+ EIA [®]	GP5+/GP6+ Reverse LBA [®]	SPF-PCR Reverse LIPA [®]	INNO-LIPA [®] (Imnogenetics)	Amplicor HPV DNA test (Roche [®])	Linear Array HPV Genotyping Test (Roche [®])
ALTO RIESGO									
16	X	X	X	X	X	X	X	X	X
18	X	X	X	X	X	X	X	X	X
26		X	X		X	X			X
31	X	X	X	X	X	X	X	X	X
33	X	X	X	X	X	X	X	X	X
35	X	X	X	X	X	X	X	X	X
39	X	X	X	X	X	X	X	X	X
45	X	X	X	X	X	X	X	X	X
51	X	X	X	X	X	X	X	X	X
52	X	X	X	X	X	X	X	X	X
53		X	X		X	X	X		X
56	X	X	X	X	X	X	X	X	X
58	X	X	X	X	X	X	X	X	X
59	X	X	X	X	X	X	X	X	X
66		X	X	X	X	X	X		X
67		X				X			X
68	X	X	X	X		X	X	X	X
69					X	X			X
70		X			X	X	X		X
73 [MM9]		X	X		X				X
82/MM4		X	X		X				X
82/IS39		X			X				X

Continuación tabla 7.

Tipos del VPH	HC2 HPV DNA assay [®]	MY09/11 Dot Blot [®]	PGMY09/11 Reverse LBA [®]	GP5+/GP6+ EIA [®]	GP5+/GP6+ Reverse LBA [®]	SPF-PCR Reverse LIPA [®]	INNO-LIPA [®] (Immogenetics)	Amplificador HPV DNA test (Roche [®])	Linear Array HPV Genotyping Test (Roche [®])
BAJO RIESGO									
6	X	X	X	X	X	X	X		X
11	X	X	X	X	X	X	X		X
40			X	X	X	X	X		X
42	X		X	X	X	X	X		X
43	X			X	X	X	X		
44	X			X	X	X	X		
54		X	X		X	X	X		X
55		X	X		X	X			X
57		X	X		X				
61		X			X	X			X
62		X				X			X
64		X				X			X
71 [CP8061]		X			X				X
72		X			X				X
74						X	X		
81 [CP8304]		X			X				X
83 [MM7]		X	X		X				X
84 (MM8)		X	X		X				X
CP6108		X			X				X

Fuente: Modificado de Ortiz y cols., 2006.

1.10 Vacuna

La identificación del VPH como principal agente causal para el desarrollo de CaCu, así como el desarrollo de pruebas moleculares para su identificación y los numerosos estudios epidemiológicos realizados, han abierto nuevas perspectivas para la prevención de la infección, como lo es el desarrollo de la vacuna contra el VPH. Su aplicación hoy en día establecida en la Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994 como el método de prevención primario para el control del CaCu (Secretaría de Salud, 2007).

Actualmente la FDA ha aprobado el uso de tres vacunas para la prevención de la infección por VPH Gardasil[®], Gardasil 9[®] y Cervarix[®] (tabla 8). Las tres previenen la infección por los tipos 16 y 18 de VPH, dos de los virus que causan el 70 % de los CaCu. Gardasil[®] impide también la infección por los tipos 6 y 11 de VPH, los cuales causan 90 % de las verrugas genitales. Gardasil 9[®] previene la infección por los mismos cuatro tipos de VPH y otros cinco tipos de VPH de alto riesgo (31, 33, 45, 52 y 58) (Instituto Nacional del Cáncer, 2016).

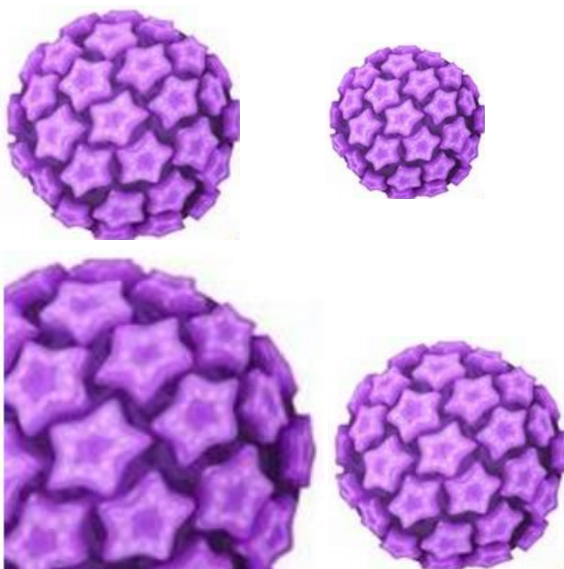
Tabla 8. Tipos de Vacunas para prevención de infección por VPH.

	Cervarix[®]	Gardasil[®]	Gardasil 9[®]
Laboratorio	GlaxoSmithKline	Merck Research Laboratories Sanofi Pasteur MSD	Merck Sharp and Dohme
Principio activo	VLP: tipos 16, 18 (20, 20 µg)	VLP: tipos 6, 11,16, 18 (20, 40, 40, 20 µg)	VLP: tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, y 58 (30, 40, 60, 40, 20, 20, 20, 20, 20 µg)
Sistema de expresión de la proteína L1	Baculovirus que utiliza células Hi-5 Rix4446 derivadas de <i>Trichoplusia ni</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CANADE 3C-5 (Cepa 1895)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CANADE 3C-5 (Cepa 1895)
Adyuvante	Formulación AS04 (500 µg Al (OH) ₃ y 50 µg de MPL ¹)	225 µg Al (PO ₄)	500 µg Al (PO ₄)
Esquema de vacunación	0, 1 y 6 meses	0, 2 y 6 meses	0, 2 y 6 meses
Edad	10 a 25 años	9 a 26 años	a partir de 9 años y adultos
Indicaciones	Prevención de las lesiones cervicales premalignas y cáncer de cérvix relacionados causalmente con los tipos 16 y 18 del VPH.	Prevención de las lesiones genitales precancerosas (cervicales, vulvares y vaginales), cáncer cervical y verrugas genitales externas (condiloma acuminata) relacionados causalmente con los tipos 6, 11, 16 y 18 del VPH	Prevención de lesiones precancerosas y cánceres de los genitales femeninos (cuello de útero, vulva y vagina); lesiones precancerosas y cánceres de ano y verrugas genitales en hombres y mujeres

1. Monofosforil lípido A

Fuente: Modificado de Ortiz y cols., 2006.

CAPITULO II. PLANTEAMIENTO
DEL PROBLEMA, PREGUNTA DE
INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS



2.1 Planteamiento del problema

Existen numerosos estudios publicados a lo largo de la historia que han demostrado la importancia de la relación que existe entre la infección por VPH y el desarrollo de cáncer cervicouterino. La infección por VPH representa una de las enfermedades de transmisión sexual más comunes a nivel mundial y en México, donde estima que 95% de las mujeres menores de 30 años con vida sexual activa han tenido infección por VPH, en la mayoría de los casos el sistema inmunológico logra eliminar la infección. No obstante, hay casos en los que el VPH puede permanecer latente y ocasionar el contagio de más personas. Las mujeres en las cuales el sistema inmunológico no logra controlar el virus pueden terminar desarrollando cáncer cervicouterino.

Actualmente no existen estudios específicos que describan la frecuencia y los genotipos que existen en las mujeres infectadas por VPH en el Estado de México, los cuales aportarían información sobre cuál es la problemática en la población para ayudar a plantear un mejor abordaje en el tratamiento y monitoreo de la infección.

Existen diversos métodos de detección para el VPH como el Papanicolaou (Pap), no obstante, los métodos moleculares constituye un método altamente sensible y poco invasivo para determinar la presencia de una infección cervical activa por VPH lo que contribuye a la detección oportuna de la enfermedad.

El presente trabajo tuvo como objetivos conocer la frecuencia y los genotipos de VPH presentes en muestras recibidas en el CICMED provenientes de mujeres mexiquenses; para lo cual, fueron seleccionadas 53 muestras de citología cervical de pacientes recibidas durante el periodo comprendido de enero a abril de 2011 del macroproyecto “Genotipificación y factores predisponentes en la infección del virus del papiloma humano y su asociación con el marcador tumoral CA-125” llevado a cabo en el CICMED.

El método de detección molecular empleado fue el Kit de Roche *Linear Array HPV Genotyping test*[®] que ofrece ventajas tales como: alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, además de permitir la detección de múltiples genotipos de VPH en una muestra.

2.2 Pregunta de Investigación

¿Cuáles serán los genotipos del Virus de Papiloma Humano que se encuentran en las muestras de citología cervical recibidas en el Laboratorio de Biología Molecular del CICMED procedentes de mujeres mexiquenses?

2.3 Objetivos

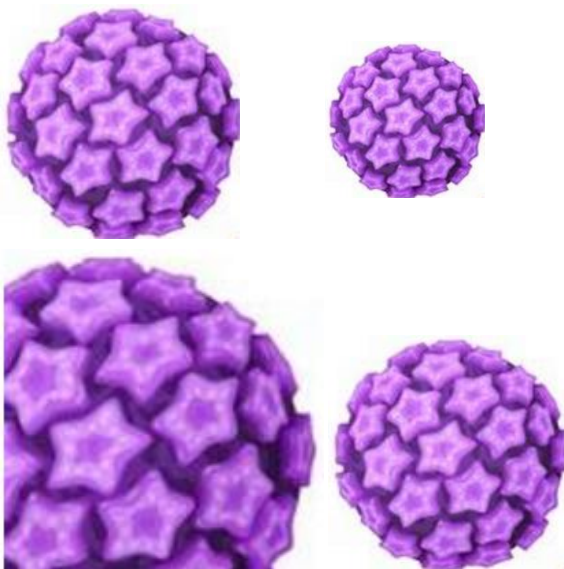
General

Conocer la frecuencia y los genotipos de Virus del Papiloma Humano presentes en muestras de citología cervical procedentes de mujeres mexiquenses, recibidas en el Laboratorio de Biología Molecular del CICMED del periodo comprendido de enero a abril de 2011.

Específicos

- 1.- Realizar la identificación de los genotipos de VPH presentes en las muestras empleando como método molecular el Kit de Roche *Linear Array HPV genotyping test*.
- 2.- Obtener la frecuencia de los genotipos encontrados en las muestras analizadas y establecer cuáles son los genotipos que se encuentran con mayor frecuencia en la población estudiada.

CAPITULO III. METODOLOGÍA



3.1 Diseño del estudio

Estudio transversal.

3.2 Tamaño de la muestra

Muestreo por conveniencia, debido a que en presente trabajo deriva del marcoproyecto “Genotipificación y factores predisponentes en la infección del virus del papiloma humano y su asociación con el marcador tumoral CA-125”, que fue financiado por la UAEMéx. Las muestras obtenidas fueron de mujeres mexiquenses que asistieron a la consulta de ginecología y colposcopia del CICMED y del Hospital Materno Perinatal Mónica Pretelini. Se recopilaron las muestras, datos y resultados de un total de 53 pacientes seleccionadas para el presente trabajo, del periodo de enero a abril del 2011.

3.3 Área de trabajo

Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Ciencia Médicas de la UAEMéx.

3.4 Criterios

Inclusión

- Mujeres residentes del Estado de México que hayan asistido a la consulta de ginecología y colposcopia del CICMED o del Hospital Materno Perinatal Mónica Pretelini.
- Haber firmado voluntariamente la carta de consentimiento informado.
- Pacientes que acudieron entre el periodo de enero a abril del 2011.
- Pacientes con y sin lesión Intraepitelial Escamosa.

Exclusión

- Muestras con resultado invalido para la técnica de genotipificación de VPH.

3.5 Conceptualización de variables

Tabla 9. Manejo de variables.

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis estadístico
Infección por VPH	Alteración del estado ontológico de salud de un individuo causada por el VPH	Infección por VPH corroborada mediante el Kit de Roche <i>Linear Array HPV genotyping test</i> [®] .	Cualitativa Nominal Dicotómica	Resultado positivo Resultado negativo	Porcentaje
Genotipo de VPH	Diferencias genotípicas entre los tipos de papiloma virus marcadas por los diferentes aminoácidos que constituyen la proteína L1	Detección de alguno(s) de los 37 genotipos detectados por el Kit	Cualitativa	Resultado positivo para alguno(s) de los siguientes genotipos de VPH: 6,11,16,18,26,31,33,35,39, 40,45,51,52,53,54,55,56,58, 59,61,62,64,66,67,68,69,70, 71, 72,73, (MM9), 81,82 (MM4), 83 (MM7), 84 (MM8), IS39 y CP6108	Frecuencia y porcentaje
Riesgo oncogénico	Capacidad que tienen algunos genotipos de VPH de producir una lesión	Riesgo que se reporta como demostrado para predisponer una lesión cancerosa	Cualitativa	Alto riesgo Bajo riesgo Probable alto riesgo Riesgo no determinado Sin clasificar	Frecuencia y porcentaje

3.6 Procedimiento

3.6.1 Información del proyecto y recolección de datos

A cada paciente se le informó en qué consistía el proyecto y se realizó la lectura de la carta de consentimiento informado, en la cual se indicó el procedimiento que se llevaría a cabo, las pacientes que estuvieron de acuerdo firmaron la carta con los términos estipulados. Se les asignó un folio, se aplicó el cuestionario “Factores predisponentes para infección por VPH” y se realizó la toma de muestra de citología cervical.

3.6.2 Toma de muestra de citología cervical

La toma de muestras fue realizada por la Dra. Migdania Martínez Madrigal en el HMPMP y el Dr. Sergio Gerardo Martínez Pérez en el CICMED. Se empleó el dispositivo Cervex-Brush® que permite el muestreo simultáneo del ecto y endo cérvix, con lo cual se logra un mejor contenido de células endocervicales y/o metaplásicas. Además del que el material hidrófobo del cepillo facilita la liberación de las células en el medio de mantenimiento. Está compuesto por fibras semicirculares, suaves y flexibles que evitan lesiones en el cérvix y disminuye el contenido de sangre en la muestra (la técnica empleada establece no más del 3.5%) que inhibe la amplificación por PCR y dar lugar a falsos negativos (ROVERS MEDICAL DEVICES, 2017; Roche Molecular Systems Inc, 2017).

Las condiciones para la toma de muestra de citología cervical de las participantes, fueron las siguientes:

- No estar menstruando o dejar pasar mínimo 5 días después de su periodo.
- No haberse aplicado pomadas, óvulos o cremas.
- No haber tenido relaciones sexuales en un mínimo de 3 días.
- Bañarse por la mañana (no duchas vaginales).

Las muestras fueron preservadas en solución PreservCyt® ya que es uno de los medios de conservación validados para la prueba de genotipado *Linear Array HPV Genotyping test*®. Es

una solución tamponada a base de metanol, que conserva las células unas tres semanas en un rango de temperatura de 4 – 37 °C (Hologic, 2010).

Todas las muestras fueron llevadas y procesadas en Laboratorio de Biología Molecular del CICMED.

3.6.3 Diagrama general del procedimiento

En el siguiente diagrama se muestran las tres etapas de las que consta el presente estudio.

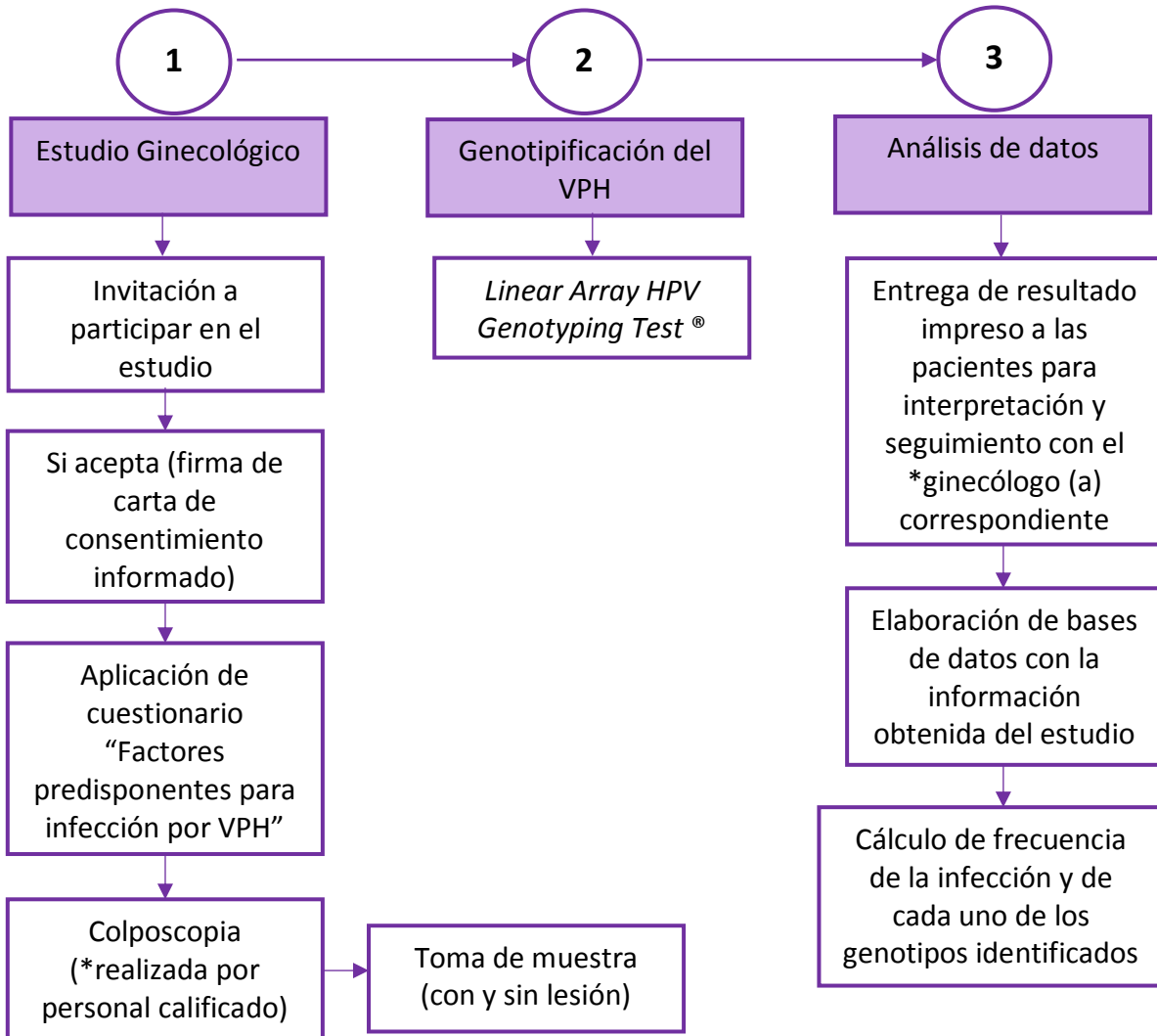


Figura 10. Diagrama general de las etapas del estudio.

* Ginecólogos: Migdania Martínez Madrigal (HMPMP) y Sergio Gerardo Martínez Pérez (CICMED).

3.6.4 Genotipificación del VPH en muestras de citología cervical

Para la detección de genotipos en las muestras recolectadas se empleó la plataforma de Roche *Linear Array HPV Genotyping Test*[®], que es un método molecular que permiten conocer el o los genotipos específicos presentes en las muestras a diferencia de los métodos convencionales. Además el kit es uno de las técnicas comerciales que identifica un mayor número de genotipos, lo cual se muestra en la tabla 7 (ver sección 1.9.3).

El kit consta de cuatro etapas principalmente:

- 1.- Preparación de las muestras: Extracción del ADN objetivo del VPH y del ADN genómico humano.
- 2.- Amplificación mediante PCR: Se selecciona y amplifica la región L1 polimórfica del genoma del VPH.
- 3.- Hibridación de los productos amplificados: El amplicón de VPH se hibrida con alguna de las sondas oligonucleótidas sólo si contiene la secuencia correspondiente de la sonda complementaria que contiene la tira de genotipado.
- 4.- Detección de los productos amplificados fijados a las sondas mediante determinación colorimétrica: Formación de un complejo de color azul que se precipita en las posiciones de las sondas donde tiene lugar la hibridación.

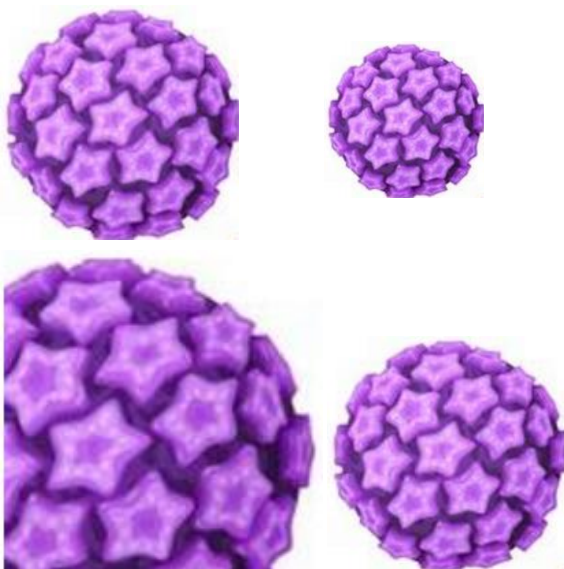
El procedimiento detallado se describe en el Anexo B.

3.7 Implicaciones éticas

El proyecto de investigación se realizó conforme a los principios estipulados en la Declaración de Helsinki (Asociación Médica Mundial, 2008) para respetar la ética de investigación llevada a cabo en seres humanos y contó con la aprobación de los Comités de Ética del Centro de Investigación en Ciencias Médicas (CICMED) y del Hospital Materno Perinatal Mónica Pretelini (HMPMP) de la ciudad de Toluca.

El macroproyecto “Genotipificación y Factores Predisponentes en la Infección por Virus del Papiloma Humano y su Asociación con el marcador tumoral CA-125” que se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Ciencias Médicas de la Universidad Autónoma del Estado de México y del cual deriva el presente trabajo, contó con una carta de consentimiento informado (Anexo A) que sirvió como respaldo de este proyecto.

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4.1 Frecuencia de infección por VPH

Se obtuvieron un total de 53 muestras de cepillado cervical de mujeres mexiquenses procedentes del CICMED y del HMPMP, de las cuales: 17 (32.08%) resultaron positivas para alguno(s) de los genotipos que detecta la técnica, mientras 36 (67.92%) resultaron negativas como se muestra en la figura 11.

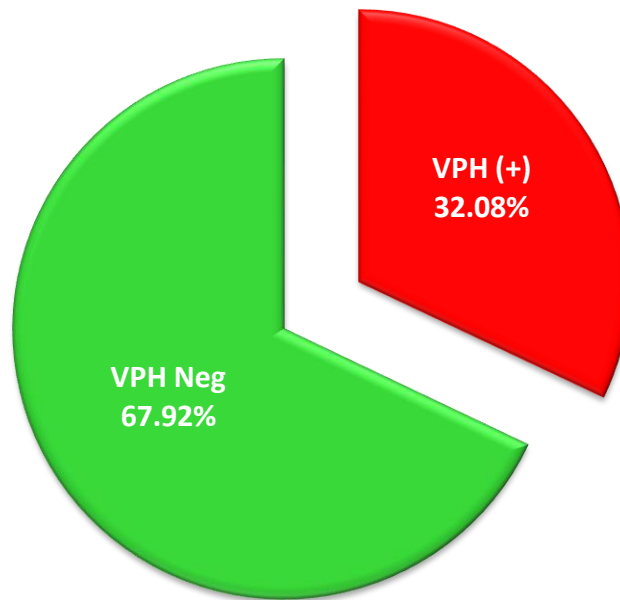


Figura 11. Frecuencia de mujeres mexiquenses infectadas por VPH.

La frecuencia obtenida de pacientes positivas para VPH (32.08%) coincide con la reportada en un estudio realizado en mujeres de Tlaxcala, donde se indicó que la infección por VPH tiene una prevalencia de 31.3% (Velázquez y cols., 2010). En otro trabajo realizado en el sureste mexicano sobre genotipificación de VPH, el virus fue identificado en el 35.92% de las muestras de mujeres (Vázquez y cols., 2015), dato que también coincide con la frecuencia encontrada en el presente estudio. De igual manera se encontró concordancia con lo reportado en muestras de mujeres de la Ciudad de México, donde se obtuvo un 36.0% de frecuencia de infección por VPH (Gallegos y cols., 2017). En la tabla 1 (ver la sección 1.1) se muestran otros

estudios realizados en población mexicana, donde se encontraron frecuencias distintas a la reportada en el presente trabajo. Esta diferencia podría deberse a que la distribución de los genotipos varía de acuerdo a la zona geográfica y a la población estudiada, lo cual se ha reportado en estudios realizados a nivel mundial (Crow 2012; de Sanjosé y cols., 2007; Bruni y cols., 2010). Aunado a esto, la prevaencia de la infección también depende del método de diagnóstico utilizado, ya que las diferencias podrían derivar de la sensibilidad y especificidad de la técnica empleada (Ortiz y cols., 2006).

En el 67.92% de las muestras no se identificó la presencia de alguno de los 37 genotipos que detecta el kit. Esto puede deberse a que posiblemente las pacientes no presentaban infección por VPH o esta ya había desaparecido, ya que se ha encontrado que la mayoría de las infecciones por VPH son transitorias e intermitentes porque el sistema inmunitario interviene de manera importante en la eliminación y control del virus. Se reporta que alrededor del 70% de las infecciones por VPH parecen desaparecer en un año y el 90% en un plazo de dos años (Goldstein y cols., 2009). La CV o el número de genomas virales también puede ser un factor que influyó en el porcentaje de muestras negativas. En la literatura se reporta que esta puede verse afectada por factores propios de las pacientes como la edad, ya que se ha observado que en las mujeres jóvenes (≤ 34 años) infectadas por VPH, la carga viral es alta, pero a menudo la infección retrocede espontáneamente, mientras que en mujeres mayores (≥ 55 años) el virus es más propenso a persistir, pero a menudo la carga viral disminuye (Lazcano y cols., 2001). En el presente estudio no se realizó dicha medición en las muestras, así que no se verificó que fuera la adecuada para la genotipificación. No obstante que el kit *Linear Array HPV Genotyping Test*[®] menciona que es un punto importante para la detección (Roche Molecular Systems Inc, 2008). La edad promedio de las pacientes que participaron en el presente trabajo es de 38.09 ± 10.87 años y por lo descrito anteriormente se sugiere que para futuros estudios sea realizado dicho análisis y se establezca un punto de corte que determine que la CV es adecuada para la detección. Otro punto muy importante es que el kit *Linear Array HPV Genotyping Test*[®] no identifica los genotipos 43, 44, 57 y 74 a diferencia de otros métodos comerciales (Ortiz y cols., 2006), razón por lo cual se pudo tener un resultado negativo en la genotipificación, pese a que

que alguna paciente estuviera infectada por alguno de estos genotipos de VPH o por nuevos tipos de virus no detectados por el procedimiento empleado.

4.2 Genotipos de VPH detectados y su frecuencia

Se identificaron un total de 18 genotipos distintos en las 17 muestras que fueron positivas para VPH. En la figura 12 se puede observar que el VPH 16 y el VPH 84 fueron los genotipos detectados con mayor frecuencia, siguiendo los genotipos 31, 45, 53, 62, y finalmente los genotipos 6, 18, 39, 51, 52, 54, 58, 66, 67, 71, 83 y CP6108 que fueron los que se encontraron con menor frecuencia.

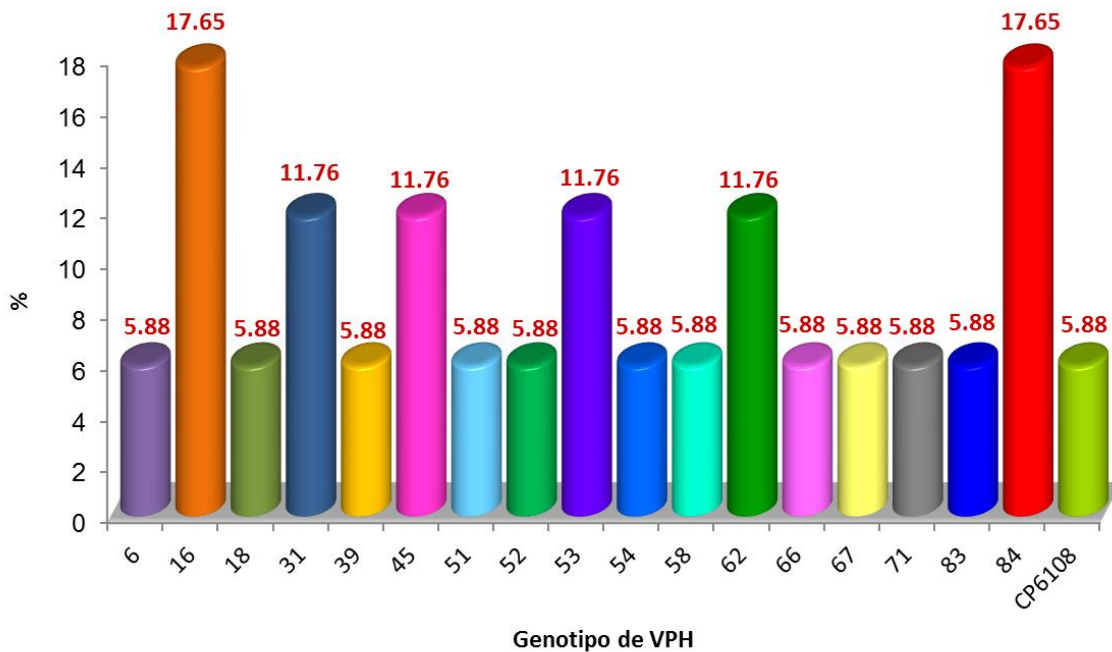


Figura 12. Frecuencia en estudio de cada genotipo de VPH detectado en las muestras.

El VPH 16 junto con el VPH 84 fueron los genotipos más frecuentes en las muestras. Con relación al VPH 16 era lo esperado, ya que es reportado como el genotipo con mayor frecuencia tanto a nivel mundial (de Sanjosé y cols., 2007; Brooks y cols., 2011) como en México (Velázquez y cols., 2010; Peralta y cols., 2012; Aguilar y cols., 2015; Ortega y cols., 2016;),

Además es uno de los VPH-AR que presenta un mayor grado de asociación con el desarrollo de CaCu (de Sanjosé y cols., 2007).

En la población mundial el VPH 84 no es reportado como uno de los más comunes. Sin embargo, en el presente estudio fue uno de los dos genotipos encontrados con mayor frecuencia (17.65%). Este genotipo fue descrito por Ishibashi y cols. (2008) como el no oncogénico más común en hombres de Cuernavaca, Morelos. A pesar de la diferencia de género, sabemos que la infección genital por VPH es por lo general transmitida por contacto sexual, así que es de esperarse que hombres y mujeres se encuentren infectados en su mayoría por los mismos genotipos de VPH. En contraste Vázquez y cols. (2015) reportaron que este genotipo fue el VPH-BR más identificado en mujeres del sureste mexicano. En otro estudio donde se incluyeron pacientes de Monterrey, Guadalajara, Tepic, Ciudad de México, Metepec y Tlaxcala el genotipo 84 fue el más frecuente en mujeres con LIEBG (Aguilar y cols., 2015). Este informe concuerda con lo encontrado en el presente estudio, ya que todas las pacientes portadoras de VPH 84 fueron diagnosticadas con LIEBG. Es importante mencionar que aunque actualmente el VPH 84 es considerado dentro del grupo de los genotipos de bajo riesgo oncogénico, no se debe subestimar su potencial, ya que tanto virus de alto riesgo como de bajo riesgo pueden ocasionar CaCu. La elevada frecuencia con la que se encontró el VPH 84 en muestras de mujeres mexiquenses y la asociación que tienen con el desarrollo de lesiones de bajo grado, son dos aspectos que se podrían tomar en cuenta para determinar si es importante prevenir la infección por este genotipo. No obstante, es indispensable realizar más estudios que establezcan más a fondo su importancia, ya que esto sólo es una sugerencia con base en los resultados obtenidos.

Los genotipos 31, 45, 53 y 62 ocuparon el segundo lugar en frecuencia (11.76%) en las muestras analizadas. El VPH 31 fue reportado como uno de los cinco más comunes en la población mundial con una frecuencia de 0.8% (Bruni y cols., 2010). En México fue identificado tanto en mujeres de Tlaxcala (Velázquez y cols., 2010) como de Nayarit (Ortega y cols., 2016), donde se consideró como uno de los tres genotipos más comunes (16.2%) y uno de los VPH-AR encontrados con mayor frecuencia, respectivamente. Con relación al VPH 45, es reportado con

una frecuencia de 0.7% en mujeres con citología normal (Information Centre on HPV and Cancer ICO/IARC, 2017), mientras que Vázquez y cols. (2015) establecieron que el VPH 45 es uno de los genotipos de alto riesgo que predominan en el sexo femenino. El genotipo 53 fue reportado como uno de los cinco más comunes entre la población de América Central con una frecuencia del 1.5% (de Sanjosé y cols., 2007). En México la prevalencia reportada del VPH 53 varía del 0.9% en muestras de mujeres sin lesión (Information Centre on HPV and Cancer ICO/IARC, 2017) al 1.32% en mujeres del sureste mexicano (Vázquez y cols., 2015). En la base de datos del *Information Centre on HPV and Cancer* ICO/IARC. (2017) se reportó que el VPH 62 fue encontrado en el 0.7% de mujeres mexicanas con citología normal, mientras que este fue identificado en el 7.3% de las muestras de hombres de Cuernavaca, Morelos (Ishibashi y cols., 2008). En el presente estudio, se observó que los genotipos 31, 45, 53 y 62 tuvieron una mayor frecuencia en comparación con otros estudios realizados en México. Esto puede deberse tal vez a la diferencia en el tamaño de la muestra, al método de genotipificación empleado o a la variabilidad en la distribución geográfica de los genotipos.

Es importante mencionar el valor predictivo que puede tener la identificación de los genotipos específicos, como en el caso de los genotipos 31 y 45, ya que fueron identificados comúnmente en muestras de CaCu de mujeres mexicanas (Peralta y cols., 2012; Aguilar y cols., 2015). No obstante en el presente estudio todas las pacientes portadoras del genotipo 31 presentaron LIEBG, mientras que las portadoras del VPH 45 fueron diagnosticadas por colposcopia con LIEAG. En el caso de las pacientes con VPH 62 se encontró coincidencia con lo reportado en la literatura ya que se ha identificado en muestras con LIEBG (Aguilar y cols., 2015). Por lo anterior, también es importante señalar la relevancia que tiene el seguimiento clínico de todas las pacientes ya sean positivas o negativas para VPH, tengan o no lesión intraepitelial escamosa.

Los genotipos restantes obtuvieron una frecuencia de 5.88% cada uno. Siete pertenecen al grupo de virus de alto riesgo (VPH 18, 39, 51, 52, 58, 66 y 67). Los cinco restantes al grupo de bajo riesgo oncogénico (VPH 6, 54, 71, 83 y CP6108). El VPH 18 se reporta a nivel mundial como uno de los más frecuentes (de Sanjosé cols., 2007; Bruni y cols., 2010, mientras que en México

existe diferentes prevalencias reportadas por Velázquez y cols. (2010), López y cols. (2012) y Vázquez y cols. (2015). En el presente trabajo, el VPH 18 fue encontrado únicamente en una de las muestras analizadas. No obstante, como posee un alto grado de asociación con el desarrollo de CaCu (Bosch José y de Sanjosé, 2003), es importante no desestimar su presencia.

El *Information Centre on HPV and Cancer* ICO/IARC. (2017) informó que la prevalencia de los genotipos 39, 66, 67 de alto riesgo junto con el VPH 54 de bajo riesgo, en pacientes mexicanas con hallazgos citológicos normales fue de 0.3%, 0.4%, 0.1% y 0.2%, respectivamente. De igual manera fueron identificados en un estudio de genotipificación del VPH efectuado en el sureste mexicano, donde el VPH 39, 67 y 54 tuvieron una prevalencia de 1.32% cada uno, mientras que el genotipo 66 fue reportado con una frecuencia de 2.65% (Vázquez y cols., 2015). Las frecuencias varían en todos los estudios. Sin embargo, su identificación es importante para entender cómo se encuentran distribuidos estos genotipos en nuestra población.

En un estudio de detección de VPH realizado en una clínica de Monterrey el VPH 51 resultó dentro del grupo de VPH-AR más frecuentes (Casillas y cols., 2017). En otro estudio realizado en una clínica de la Ciudad de México el VPH 51 (42%) y VPH 52 (38%) fueron los más frecuentes en muestras de citología cervical (Gallegos y cols., 2017). En el presente trabajo las frecuencias obtenidas fueron menores a las mencionadas anteriormente. En el caso del VPH 52 la frecuencia podría estar subestimada en el presente estudio, debido a que no se puede descartar la coinfección con el VPH 58 por la reacción cruzada que existe en la tira de hibridación del Kit *Linear Array HPV genotyping test*® (Roche Molecular Systems Inc, 2008). En la población mundial el VPH 52 y el VPH 58 fueron registrados dentro de los cinco más comunes (Bruni y cols., 2010). Además el genotipo 58 fue identificado como uno de los más frecuentes en pacientes mexicanas con y sin lesión, pero con una mayor prevalencia en mujeres con diagnóstico de LIEAG (Peralta y cols., 2012), dato que coincidió con el presente trabajo.

La frecuencia del VPH 6 es reportada alrededor del 10.0% en dos estudios realizados en mujeres mexicanas (Velázquez y cols., 2010; Vázquez y cols., 2015), es decir por encima de la encontrada en el presente trabajo, lo cual no descarta su importancia, al igual que en los

anteriores casos. Aparte este genotipo fue clasificado como de bajo riesgo oncogénico (Muñoz y cols., 2003) pero se ha reportado su identificación en LIEAG (Aguilar y cols., 2015).

La identificación de los de los genotipos 71 y 83 fue reportada en México por el *Information Centre on HPV and Cancer* ICO/IARC. (2017) con una frecuencia de 0.4% y 0.3%, respectivamente. Sin embargo, aunque la frecuencia reportada de esos dos genotipos junto con el VPH CP6108, fue bajo o nula en otros estudios, esto podría deberse al método de identificación empleado o a la distribución geográfica de los genotipos, es importante mencionar que en México, se ha reportado su presencia en muestras con LIEBG y CaCu, casos similar al del genotipo CP6108 que se ha identificado en pacientes con LIEBG (Aguilar y cols., 2015). En el presente estudio las pacientes portadoras de estos tres genotipos tuvieron diagnóstico de LIEBG. Resultado que concuerda con lo mencionado anteriormente. Aunado a esto, el VPH 71 es considerado un genotipo de bajo riesgos, pero se ha reportado que la proteína E6 de este genotipo degrada de manera eficiente a p53 (Fu y cols., 2010), lo cual podría sugerir un alto potencial oncogénico. A pesar de ello, es necesario realizar más estudios, que establezcan su frecuencia en la población y su grado de asociación con el desarrollo CaCu.

4.3 Frecuencia de genotipos de alto y bajo riesgo oncogénico

Como se puede observar en la figura 13 los genotipos de alto riesgo oncogénico son los que presentaron una mayor frecuencia en las muestras de citología cervical. Dato que coincide con lo reportado en otros estudios, donde se señala que la infección por genotipos de alto riesgo es más alta que la producida por genotipos de bajo riesgo oncogénico (Capdeville y cols., 2009; López y cols., 2012; Vázquez y cols., 2015; Casillas, 2017). Lo cual podría sugerir que las mujeres mexiquenses infectadas por VPH tienen un alto riesgo de desarrollar de CaCu. Sin embargo sabemos que la infección por VPH es la causa necesaria pero no suficiente para el desarrollo de CaCu, por lo cual es necesario analizar otros factores como el inicio de actividad sexual a temprana edad, el número de parejas sexuales, nivel socioeconómico, la carga viral y la variación intratipo del VPH, los cuales podrían aumentar el riesgo en nuestra población.

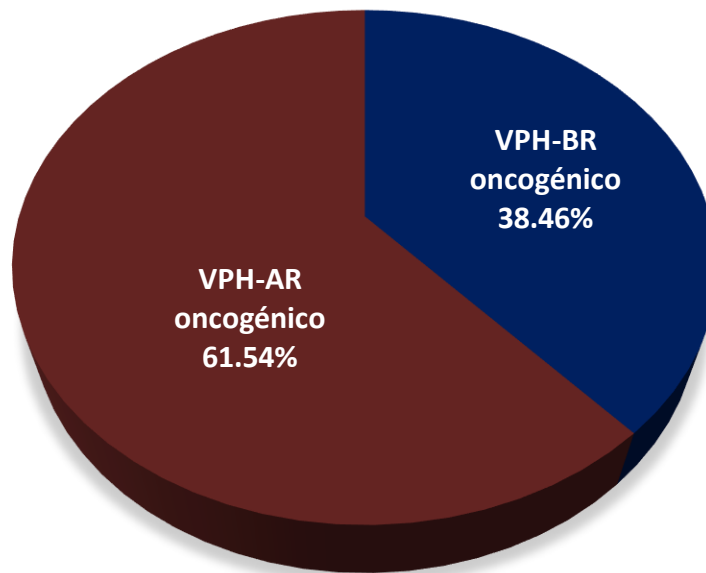


Figura 13. Resultado de los genotipos de VPH encontrados de acuerdo a su riesgo oncogénico.

Los genotipos detectados se clasificaron de acuerdo a su riesgo oncogénico y se obtuvieron sus frecuencias, lo cual se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Frecuencia de genotipos de alto y bajo riesgo oncogénico en las muestras analizadas.

Genotipos del VPH	Frecuencia (%)	Genotipos del VPH	Frecuencia (%)
Alto Riesgo		Bajo Riesgo	
16	18 (11.53)	6	6 (3.84)
18	6 (3.84)	54	6 (3.84)
31	12 (7.69)	62	12 (7.69)
39	6 (3.84)	71 [CP8061]	6 (3.84)
45	12 (7.69)	83 [MM7]	6 (3.84)
51	6 (3.84)	84 (MM8)	18 (11.53)
52	6 (3.84)	CP6108	6 (3.84)
53	12 (7.69)		60 (38.46)
58	6 (3.84)		
66	6 (3.84)		
67	6 (3.84)		
	96 (61.54)		

La distribución encontrada de los genotipos en este trabajo, donde el VPH 16 ocupó el primer lugar de frecuencia dentro del grupo de los virus de alto, seguido por el genotipo 31, 45 y 53. En un estudio publicado en 2009 se reportó que la vacuna con adyuvante AS04 (Cervarix®) aparte de mostrar una alta eficacia contra los genotipos 16 y 18 también ofrece protección cruzada parcial contra el VPH 31, 33 y 45 (Paavonen y cols., 2009). Caso similar al de la vacuna Gardasil 9® que previene la infección por los genotipos 16, 18, 6 y 11 más otros cinco tipos de VPH de alto riesgo donde se incluye el VPH 31 y 45. No obstante en el Estado de México, se aplica la vacuna tetravalente que únicamente incluye los genotipos 16, 18, 6 y 11 (Secretaría de Salud, 2018), razón por la cual las mujeres mexiquenses no estarán protegidas parcialmente contra esos genotipos, ni contra los otros cinco de alto riesgo (VPH 39, 51, 53, 66 y 67) y los

seis de bajo riesgo (VPH 54, 62, 71, 83, 84 y CP6108) que también fueron identificados en nuestras muestras. Los cuales no se encuentran incluidos en ninguna de las tres vacunas existentes.

4.4 Comparación entre el resultado por genotipificación y el diagnóstico por colposcopia

Se hizo la comparación del resultado obtenido en la muestras mediante genotipificación (VPH positivas y VPH negativas) con el resultado del diagnóstico por colposcopia (figura 14) y se observó que todas las pacientes que presentaron LIEAG estaban infectadas por VPH. Mientras que, sólo en el 33.33 % de las pacientes con LIEBG se identificó la presencia de alguno(s) de los 37 genotipos de VPH que detecta la plataforma de Roche *Linear Array HPV Genotyping Test*®.

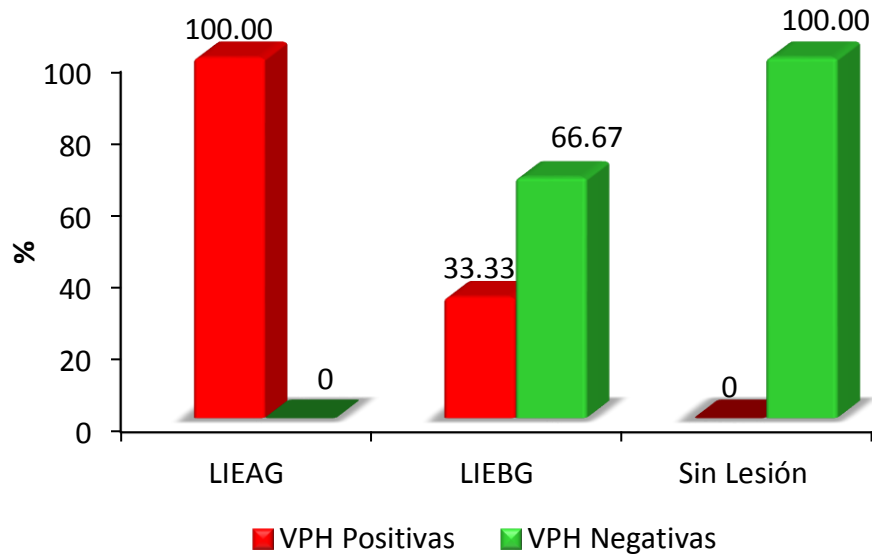


Figura 14. Resultado de la distribución del VPH acuerdo al tipo de lesión intraepitelial escamosa.

La distribución en nuestros datos es similares a la reportada en una revisión sistemática publicada en 2012, donde se encontró que la prevalencia de VPH en mujeres mexicanas con LIEAG, LIEBG y Normal (sin lesión) es de 75.5, 42 y 15 %, respectivamente (Peralta y cols., 2012).

En el 66.67% de las pacientes con LIEBG por colposcopia no se detectó ningún VPH. Esta discrepancia puede deberse posiblemente a que: la CV presente en las muestras no fue la adecuada para la detección; la presencia de nuevos genotipos de virus en las muestras de citología cervical, los cuales no pueden ser detectados por el método empleado o al sobre diagnóstico en la colposcopia (Curiel y cols., 1999). Es importante señalar que tampoco se puede descartar la presencia de infección por VPH en los casos de pacientes sin lesión ya que se ha reportado la presencia de este virus en pacientes clínica y citológicamente sanas (Capdeville y cols., 2009; Peralta y cols., 2012; Aguilar y cols., 2015).

4.5 Frecuencia de mono-infección y coinfección

Se agruparon las muestras con base en el número de genotipos identificados, como se muestra en la tabla 11. Actualmente se desconoce la importancia clínica y epidemiológica tanto de las coinfecciones como de las combinaciones de los genotipos involucrados. Sin embargo, en México se ha reportado que la prevalencia de coinfecciones es mayor a la de mono-infecciones, la cual varía de acuerdo a la zona geográfica analizada (Vázquez y cols., 2015; Orte y cols., 2016; Gallegos y cols.2017). En el presente trabajo, se encontró que la mayoría de las muestras de mujeres mexiquenses (52.94%) presentan infección por un sólo genotipo, mientras que en el 47.06% restante se identificó la presencia de coinfección, siendo la más común la que involucra dos genotipos. Datos que coincide con lo reportado en un estudio realizado en una clínica de Monterrey donde se reportó un porcentaje de coinfecciones del 41.0%, del cual el 23.0% corresponde a infecciones producida por dos genotipos (Casillas y cols., 2017).

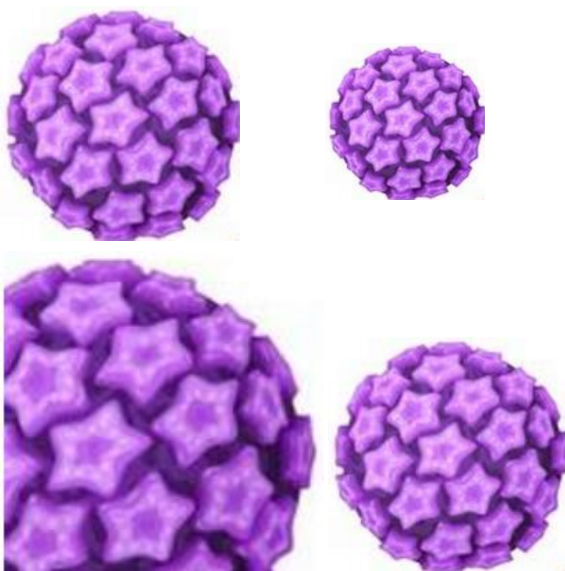
Tabla 11. Número de genotipos de VPH identificados en las muestras.

No. de Genotipos	N (%)
Uno	9 (52.94)
Infección múltiple	8 (47.06)
Dos	7 (41.18)
Tres	1 (5.88)

En el presente estudio el genotipo 16 se encontró en coinfección en el 66.67% de las muestras. Lo cual coincide con lo reportado en la literatura, donde se menciona que las coinfecciones más identificadas son las que involucran al VPH 16 (Ortega y cols., 2016; Gallegos y cols., 2017).

Por otro lado se observó que en el presente estudio, el genotipo 84 se encontró en coinfección en todos los casos. Como se mencionó anteriormente, aún se desconoce el papel que juegan las coinfecciones en el desarrollo de lesiones escamosas intraepiteliales, sin embargo hay reportes que indican que se encuentran en el 58.2% de las LIEBG (Aguilar y cols., 2015). En nuestros resultados se encontró que todas las muestras donde fue identificada la presencia de más de un genotipo tuvieron diagnóstico de LIEBG.

CAPITULO VI. CONCLUSIONES



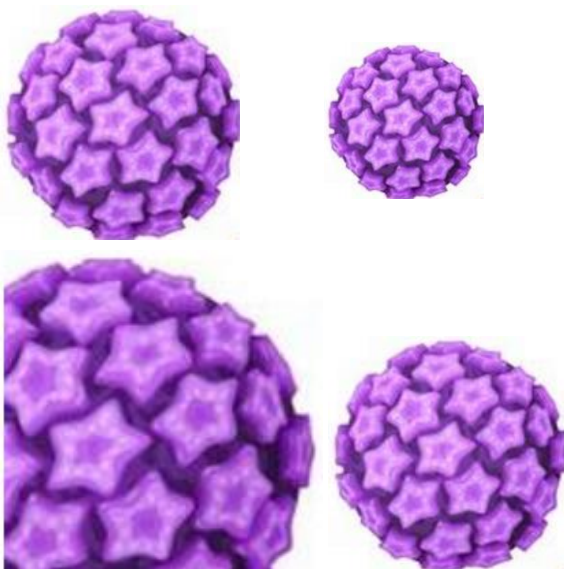
- ❖ La prevalencia de infección por VPH que se encontró fue de 32.08%.

- ❖ En las muestras de citología cervical de mujeres mexiquenses se identificaron los genotipos: VPH 6, 16, 18, 31, 39, 45, 51, 52, 53, 54, 58, 62, 66, 67, 71, 83, 84 y CP6108.

- ❖ Los genotipos identificados con mayor frecuencia, fueron el VPH 16 y el VPH 84.

- ❖ Se identificó la presencia de coinfecciones en el 47.06% de las muestras.

CAPITULO VII. REFERENCIAS



Abreu AL (2012). A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virology Journal*, 9(262), 2-9. Obtenido de <http://doi.org/10.1186/1743-422X-9-262>.

Aguilar LA, Vallejo V, Cortés EI, Salgado ME, Ramos NP, Ortega L. cols. (2015). Human papillomavirus infections in Mexican women with normal cytology, precancerous lesions, and cervical cancer: type-specific prevalence and HPV coinfections. *J. Med. Virol*(87), 871–884. doi:10.1002/jmv.24099.

Alameda F, Carreras R (2007). Histopatología, citopatología, inmunohisquímica y determinación del virus del papiloma humano. En R Carreras, J Xercavins y M. Checa. *Virus del papiloma humano y cáncer de cuello de útero* (págs. 43-50). Madrid: Médica Panamericana .

American Cancer Society Inc. (8 de Julio de 2014). American Cancer Society. Recuperado el 24 de Octubre de 2017, de ¿Cómo se contrae el VPH genital?: <http://www.cancer.org>.

Asociación Médica Mundial (2008). Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. 59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008.

Baseman JG, Koutsky LA (2005). The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology*, S16-S24.

Bosch FX, de Sanjosé S (2003). Chapter 1: Human Papillomavirus and Cervical Cancer—Burden and Assessment of Causality. *JNCI Monographs*, 3-13. Obtenido de : <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003479>.

Bosch FX, Diaz M, de Sanjosé S, Font R, Castellsagué X, Albero G (2006). Epidemiología de las infecciones por el virus del papiloma humano (VPH): riesgo de carcinoma cérvico-uterino y otros tumores ano-genitales. Nuevas opciones preventivas. En S. De Sanjosé y AM. García, *Virus del papiloma humano y cáncer: epidemiología y prevención. 4a Monografía de la Sociedad Española de Epidemiología* (págs. 31-71). Madrid: EMISA.

Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah K (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of clinical pathology*, 55(4), 244-265.

Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA (2011). Virus que causan cáncer en el ser humano. En E Jawetz, JL Melnick, G Adelberg, Jawetz, Melnick y Adelberg: *Microbiología médica* (25 a ed., págs. 602-605). México: McGraw Hill México.

Bruni L., Diaz M, Castellsagué M, Ferrer E, Bosch F, de Sanjosé S (2010). Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *Journal of Infectious Diseases*, 202(12), 1789-1799.

Capdeville D, Martínez SG, Gutiérrez S, Pérez C, Piña RE, Gutiérrez A (2009). Detección del virus del papiloma humano en pacientes sin coilocitosis pero con cambios nucleares en citologías cervicales. *Gaceta mexicana de oncología*, 184-188.

Carozzi F, Ronco G, Gillio-Tos A, De Marco L, Del Mistro A, Girlando S, cols. (2012). Concurrent infections with multiple human papillomavirus (HPV) types in the New Technologies for Cervical Cancer (NTCC) screening study. *European Journal of Cancer*, 1633 – 1637.

Casillas N, Flores A, Lozano S, Pérez F, Llaca J (2017). P3.35 Frequency of human papillomavirus and genotypes in population attending a women`s clinic in monterrey, Mexico. *Sex Transm Infect*(93), A106.

Crow JM (2012). The global burden. *Nature*, 488(7413), S2-S3.

De Guglielmo Z, Rodríguez A (2010). Métodos utilizados en la identificación del virus de papiloma humano. Recuperado el Septiembre de 28 de 2016, de *Anales Sis San Navarra*: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-36342006000500003>.

De la Fuente D, Guzmán S, Barboza O, González RA. (2010). Biología del Virus del Papiloma Humano y técnicas de diagnóstico. *Medicina Universitaria*, 231-238.

de Sanjosé, S., Diaz, M., Castellsagué, X., Clifford, G., Brun, L., Muñoz, N., & Bosch, F. X. (2007). Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*, VII(7), 453-459.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur HH. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324, 17-27.

Doorbar J (2005). The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*, 32, 7-15.

Espinosa R, Arreola R, Velázquez N, Rodríguez E (2014). Métodos de detección oportuna del cáncer cervicouterino. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 13, 48-52.

Frazer IH (2004). Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nature reviews. Immunology*, 4(1), 46.

Fu L, Van Doorslaer K, Chen Z, Ristrain T, Masson M, Trave G, Burk RD. (Septiembre de 2010). Degradation of p53 by human Alphapapillomavirus E6 proteins shows a stronger correlation with phylogeny than oncogenicity. *PLoS One*, 5(9), 1-7.

Gallegos J, Rivera JA, Presno JM, Cervantes RD (2017). High prevalence of co-infection between human papillomavirus (HPV) 51 and 52 in Mexican population. *BMC Cancer*. doi:10.1186/s12885-017-3519-7.

Goldstein MA, Goodman A, del Carmen MG, Wilbur DC (2009). Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 10-2009. A 23-year-old woman with an abnormal Papanicolaou smear. *N. Engl. J. Med.*, 1337-1344.

Graham SV. (2010). Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future Microbiology*, 5(10), 1493–1506. Obtenido de <http://doi.org/10.2217/fmb.10.107>.

Gutiérrez L, de la Fuente D, Astudillo H (2014). Biología molecular para el diagnóstico del cáncer cervicouterino. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 25-30.

Hologic (2010). ThinPrep® PreservCyt® Solution Material Safety Data Sheet (MSDS). California.

Hubbard RA. (2003). Human Papillomavirus Testing Methods. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 127(8), 940-945.

Information Centre on HPV and Cancer ICO/IARC (2017). HPV Information Centre. Recuperado el 13 de Junio de 2017, de M1. HPV prevalence estimates - Women with normal cervical cytology - HPV type distribution: <http://www.hpvcentre.net>.

Instituto Nacional de Salud Pública. (23 de Septiembre de 2013). Instituto Nacional de Salud Publica. Recuperado el 22 de Febrero de 2016, de Salud Poblacional: <http://www.insp.mx/noticias/salud-poblacional/1308-muy-alto-el-porcentaje-de-mujeres-menores-de-30-anos-con-vph.html>

Instituto Nacional de Salud Pública. (24 de Agosto de 2015). Instituto Nacional de Salud Pública. Recuperado el 5 de Noviembre de 2016, de Aplicaciones de la técnica: <http://www.insp.mx/centros/salud-poblacional/enlaces/ladimol-vph/metodos-de-analisis/97-enlaces/ladimolvph/1056-aplicaciones-de-la-tecnica.html>

Instituto Nacional del Cáncer. (2 de Noviembre de 2016). Recuperado el 6 de Septiembre de 2017, de Vacunas contra los virus del papiloma humano: https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/germenes_infecciosos/hoja-informativa-vacuna-vph#q4.

Ishibashi MA, Antunes JA, Aoki MF, Terreri RB, Brito E, Silva RC, Yoshiaki MR, cols. (2008). Human Papillomavirus infection in men residing in Brazil, Mexico, and the USA. Salud Pública de México, 408-418.

Lazcano E, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P, Hernández M, cols. (2001). Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. International Journal of Cancer, 91(3), 412-420.

López MG, Medel MO, Villalba JD, Sánchez V (2012). Prevalence of Human Papillomavirus in Women from Mexico City. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2012, 1-4. doi: <http://doi.org/10.1155/2012/3>.

López A, Lizano M (2006). Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología* 1, 31-55.

Mascareñas A, Ortiz A, Cruz A, Sams S (2007). Virus del Papiloma Humano. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pedriatría*, XX(80), 1-6.

Muñoz N, Bosch X, De Sanjosé S, Herrero R, Xavier C, Shah KV cols. (2003). Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 518-527.

Nobelprize.org. (22 de Febrero de 2016). Obtenido de Harald zur Hausen – Biographical: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2008/hausen-bio.html.

Ortega L, Aguilar A, Rojas AE, Barrón BS, Vallejo V, Cantú D, cols. (2016). Human papilloma virus genotypes in women from Nayarit, Mexico, with squamous intraepithelial lesions and cervical cancer. *International Journal of Health Sciences*, 10(3), 327-338.

Ortiz M, Torres M, García A (2006). Determinación del virus del papiloma humano (VPH): aspectos técnicos. En S de Sanjosé y AM García, *Virus del Papiloma Humano y Cáncer: Epidemiología y Prevención* (págs. 89-103). Madrid: EMISA.

Oviedo G, Arpaia AL, Ratia E, Seco N, Rodríguez I, Ramírez Z. (2004). Factores de Riesgo en Mujeres con Infección del Virus del Papiloma Humano. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 69(5), 343-346. Obtenido de <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75262004000500002>.

Paavonen J, Naud P, Salmerón J, Wheeler CM, Chow SN, Apter D (25 de Julio de 2009). Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and

precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *The Lancet*, 374(9686), 301-314.

Parkin DM (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International Journal of Cancer*, 118(12), 3030-3044.

Peralta R, Romero P, Villegas V, Mendoza M, Taniguchi K, González B, cols. (2012). Prevalence of human papillomavirus in the cervical epithelium of Mexican women: meta-analysis. Recuperado el 26 de Septiembre de 2017, de *Infectious Agents and Cancer*: <http://doi.org/10.1186/1750-9378-7-34>.

Peyton R, Beard JW. (1935). Progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas. *The Journal of Experimental Medicine*, 523–548.

Pineda MB, Ceballos RM (2008). Evaluación de Tecnologías para la Salud: Evaluación de la Efectividad de los dispositivos para la toma de Frotis de Papanicolaou. Secretaría de Salud.

QIAGEN (2013-2017). Recuperado el 3 de Noviembre de 2017, de digene HC2 HPV DNA Test: <https://www.qiagen.com/us/shop/detection-solutions/human-pathogens/digene-hc2-hpv-dna-test/#productdetails>.

Roche Molecular Systems Inc. (2008). LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test Roche. 18. USA: Roche Diagnostics.

Roche Molecular Systems Inc. (21 de Noviembre de 2017). Roche Molecular Diagnostics. Recuperado el 11 de Julio de 2017, de LINEAR ARRAY® HPV Genotyping Test: <https://molecular.roche.com/assays/linear-array-hpv-genotyping-test/>.

ROVERS MEDICAL DEVICES. (5 de Agosto de 2017). ROVERS® MEDICAL DEVICES. Obtenido de Cervex-Brush®: <http://www.roversmedicaldevices.com/cell-sampling-devices/cervex-brush/>.

Ruíz JA. (2003). Infección genital por virus del papiloma humano. En J. R. Ahued Ahued, C. Fernández del Castillo, & R. Bailón Uriza, *Ginecología y obstetricia aplicadas* (Segunda ed., págs. 755-762). México: El Manual Moderno, S. A. de C. V.

Samorski R, Gissmann L, Osen W. (2006). Codon optimized expression of HPV 16 E6 renders target cells susceptible to E6-specific CTL recognition. *Immunol Lett*, 107, 41-9.

Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodríguez AC, Wacholder S (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, 370(9590), 890-907.

Secretaría de Salud. (18 de Mayo de 2007). MODIFICACION a la Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994. Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cérvico uterino. *Diario Oficial de la Federación*.

Secretaría de Salud. (13 al 19 de Abril de 2014). Desarrollo, Evolución y Estadística del Virus del Papiloma Humano. *Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información*, 31(16), 1-9.

Secretaría de Salud. (8 de Febrero de 2018). *Instituto de Salud del Estado de México*. (S. d. Salud, Editor) Recuperado el 2018 de Febrero de 9, de Virus del Papiloma Humano (VPH): <http://salud.edomexico.gob.mx/html/article.php?sid=1010>

Tinnirello Md (2008). Colposcopia: fundamentos, técnica e imágenes fisiológicas del cuello uterino. En S. A. Tatti, *Colposcopia y Patologías del tracto genital inferior En la era de la vacunación* (págs. 95-106). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Torres FJ, Alameda F, Ordi J, Costa I (2012). Utilidad de la inmunohistoquímica en el diagnóstico histológico y en el manejo de las lesiones del cuello uterino. *Revista Española de Patología*, 86-95.

Varela S (2005). Cítologia Cervical. *Revista Médica Hondureña*, 73, 131-136.

Vázquez TV, Gómez SG, Solís RA (2015). Genotipificación del virus del papiloma humano en el sureste mexicano. *Salud en Tabasco*, 21(1), 7-11.

Velázquez N, Jiménez LJ, Sánchez P, Santos G, Reyes J, Vallejo V (2010). Human Papillomavirus Infection In Women From Tlaxcala, México. *Brazilian journal of microbiology*, 749-755.

Vilata JJ (2001). *Infección por el virus del papiloma humano (VPH)*. Barcelona: Prog Obstet Ginecol.

World Health Organization IARC. (2017). *International Agency for Research on Cancer. World Health Organization*. Recuperado el 22 de Febrero de 2016, de GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx

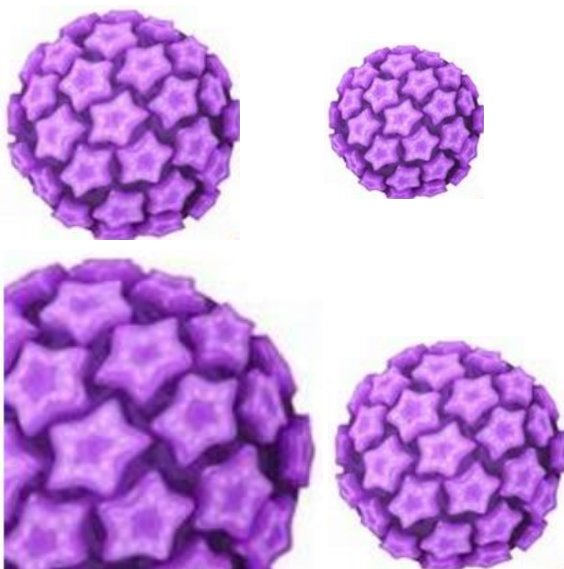
Xi LF, Koutsky LA, Castle PE, Edelstein ZR, Meyers C, Ho J, Schiffman M (2009). Relationship Between Cigarette Smoking and Human Papilloma Virus Types 16 and 18 DNA Load. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 3490-3496. doi:DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0763

Zur HH (1977). Human Papillomaviruses and Their Possible Role in Squamous Cell Carcinomas. En W. Arber, W. Henle, P. H. Hofschneider, J. H. Humprey, J. Klein, P. Koldovský, . . . P. K. Vogt, *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 78, págs. 1-30). Springer, Berlin, Heidelberg.

zur HH (1996). Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1288(2), F55-F78.

zur HH. (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology*, 384(2), 260–265.

CAPITULO VIII. ANEXOS



Anexo A: Carta de consentimiento informado

Toluca, México, a _____ de _____ de 201__.
Nombre del paciente _____

Se le invita a participar en el proyecto de investigación “**Genotipificación y factores predisponentes en la infección del virus del papiloma humano y su asociación con el marcador tumoral CA-125**”.

Información general:

El virus del papiloma humano es el nombre de un grupo de virus de los cuales algunos producen cambios anormales en el cuello uterino que pueden estar asociados con el desarrollo de cáncer. El virus del papiloma humano es un grupo grande de virus de los cuales se han identificado más de 100 tipos, de éstos cerca de 40 son transmitidos sexualmente e infectan órganos sexuales tanto en el hombre como en la mujer.

El objetivo del estudio:

Identificar la presencia del virus del papiloma humano en una muestra de cérvix, la cual se tomará en una cita posterior a la de su estudio de colposcopia. Así como también, se tomará una muestra sanguínea para la determinación del antígeno CA-125 y otra para análisis posteriores a fin de conocer la fisiopatología de su padecimiento.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en acudir a una cita en la cual:

- Firma de carta de consentimiento informado y contestar cuestionario de factores predisponentes
- Se me tomará una muestra de cérvix, empleando un cepillo o hisopo desechable y estéril, por el personal médico o químico especializado.
- Una toma de muestra sanguínea, para la detección del antígeno CA-125, Biometría Hemática, Química sanguínea.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:

- **Riesgos, inconvenientes y molestias:** No existen riesgos de infección, ya que el material empleado es nuevo, desechable y estéril. En algunos casos, la toma de muestra podrá generar un pequeño sangrado, debido a que se hace un pequeño raspado del cérvix, el cual termina casi de inmediato. Las molestias son aquellas propias del proceso al cual está solicitando. En la toma de muestra sanguínea se podría presentar: algún hematoma, mareos ligeros o la necesidad de realizar una segunda punción en caso de venas difíciles.
- **Beneficios:** Se me hará entrega del resultado por escrito de los estudios en los que haya participado, así mismo, se me podrá orientar el tipo de institución de salud que pudiera atenderme.

El Investigador se ha comprometido a darme información a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Centro.

El Investigador me ha dado seguridad de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial, quedando registrado con el **NUMERO DE FOLIO** _____.

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado: “Genotipificación de virus del papiloma humano y factores predisponentes, asociado al marcador tumoral CA-125”

Nombre y firma del paciente

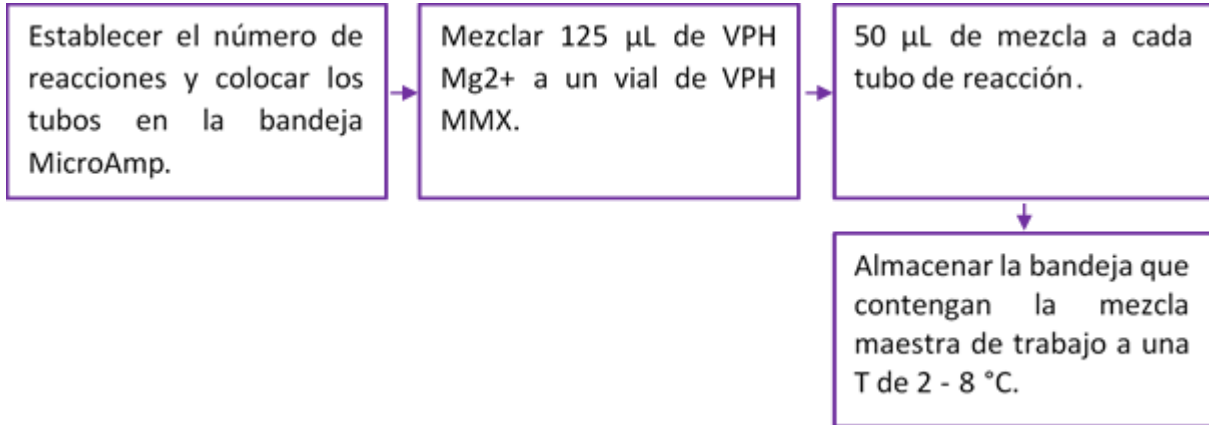
María del Socorro Camarillo Romero
Investigador Responsable
Centro de Investigaciones en Ciencias Médicas

Av. Jesús Carranza No. 205. Col Universidad, Toluca, Méx. C. P. 50130
Tels (01722) 2806822 y 2194122

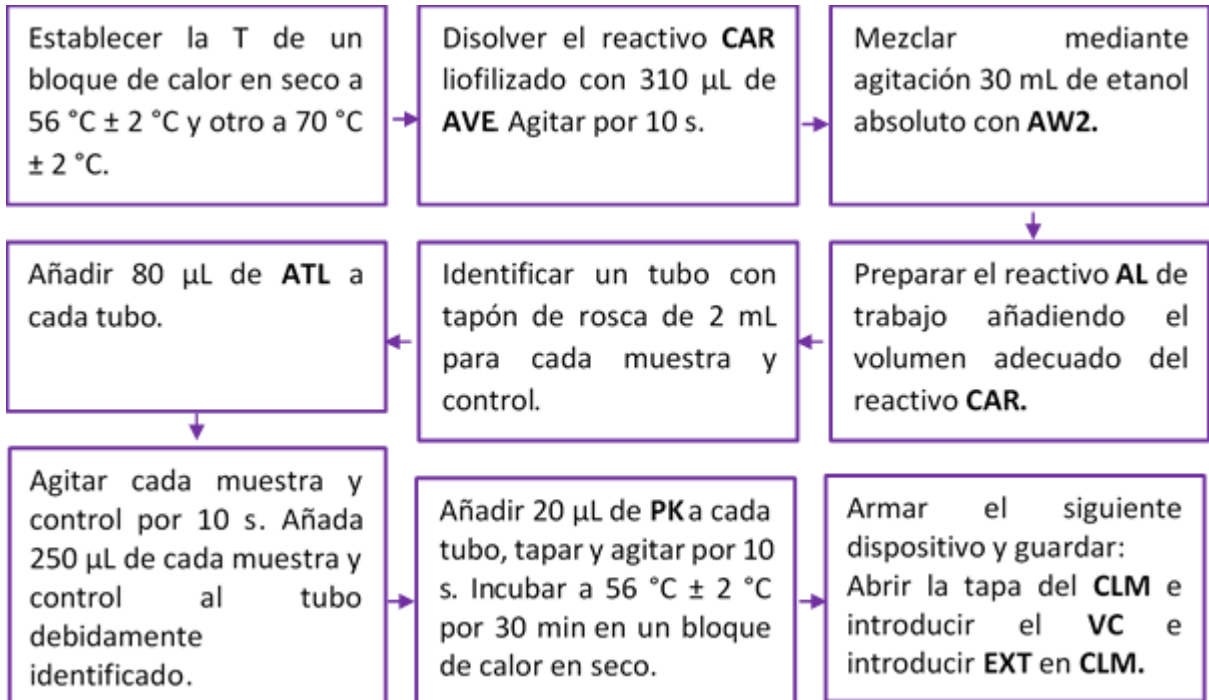
Anexo B: Diagramas de las tres etapas del método de genotipado Linear Array HPV Genotyping Test®.

a) Extracción de ácidos nucleicos

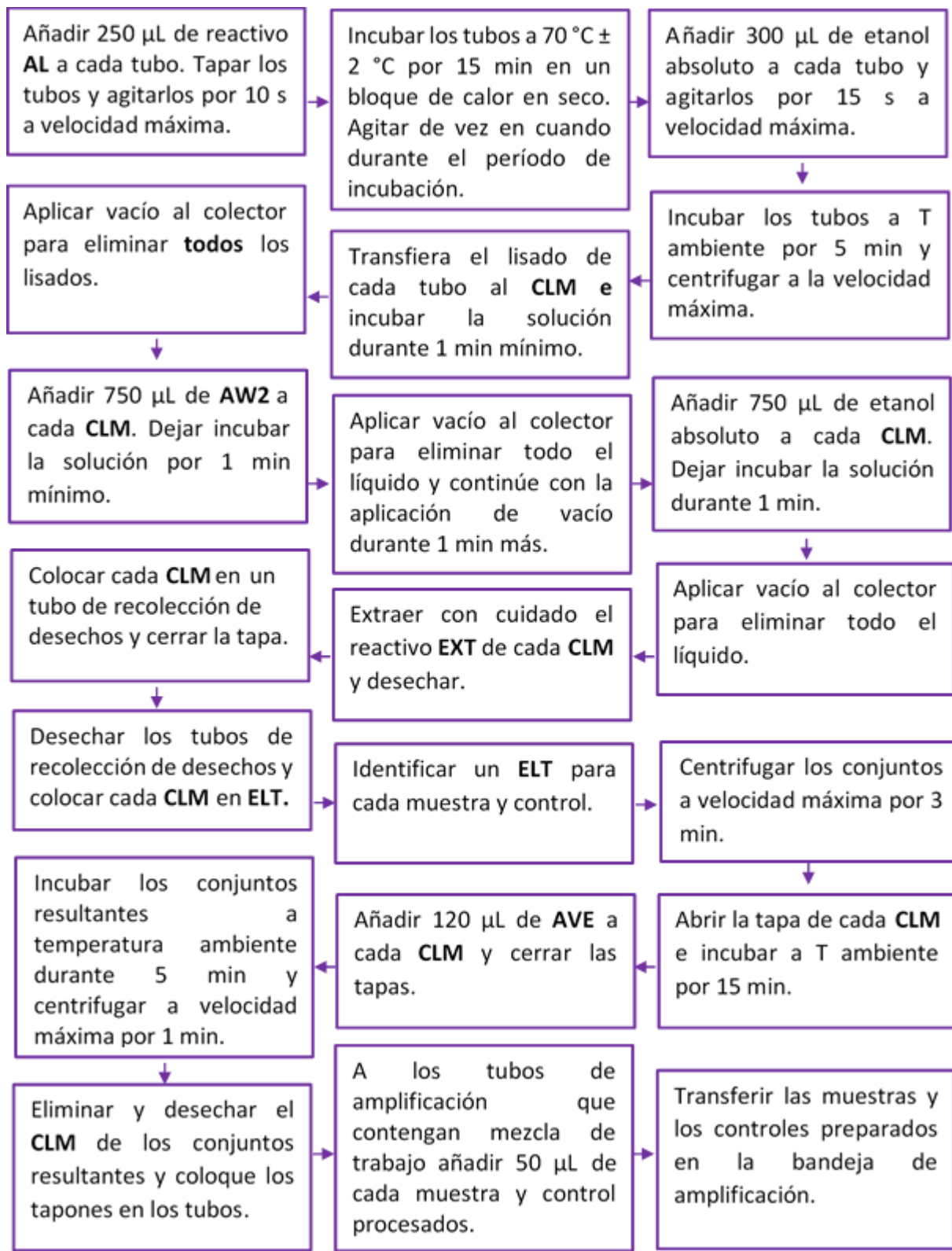
1. Preparación de Reactivos



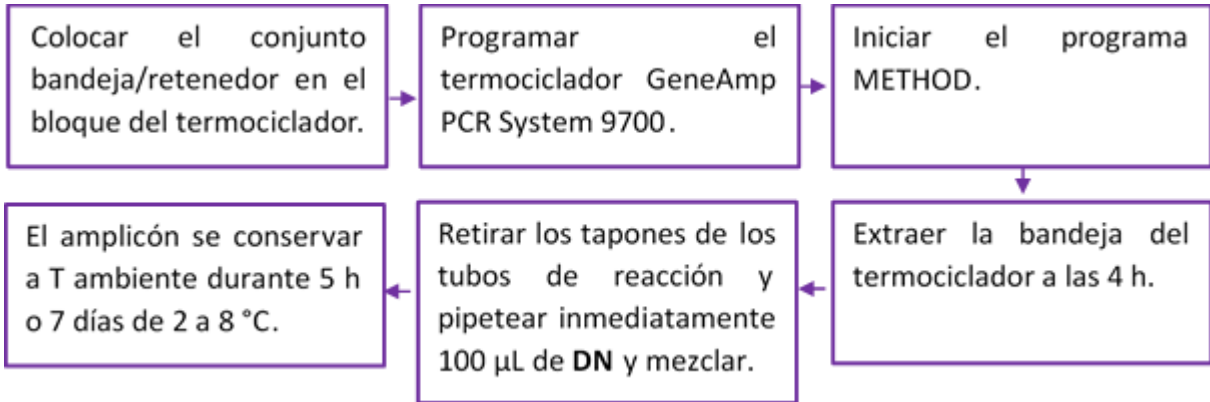
2. Preparación de muestras y controles



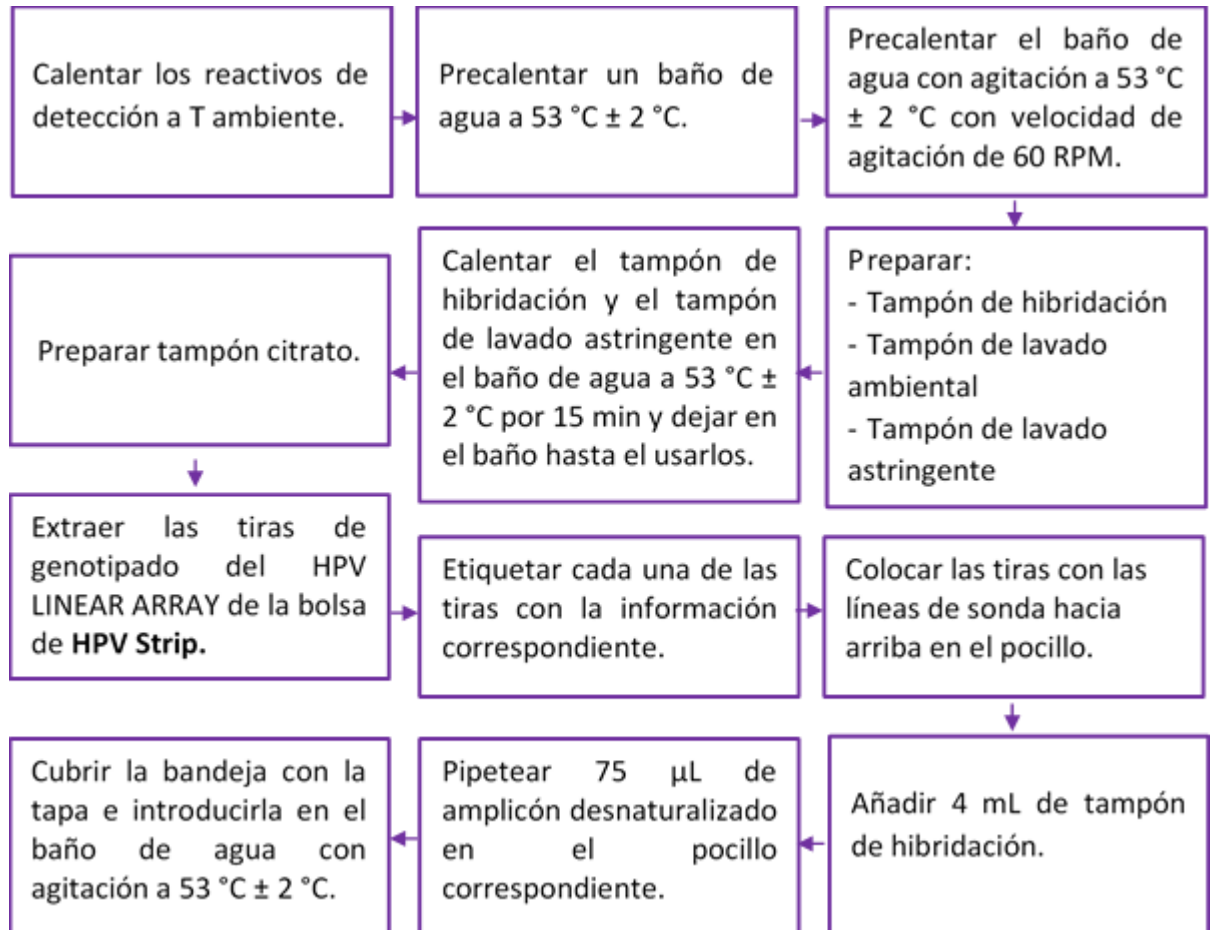
Continuación de Preparación de muestras y controles



b) Amplificación



c) Detección de genotipo (s)



Continuación detección de genotipos

