

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**DETECCION Y TIPIFICACION DE VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN
PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE CANCER CERVICO UTERINO EN
EL INSTITUTO DE CANCEROLOGIA (INCAN) DE GUATEMALA
POR MEDIO DE PCR ANIDADO MULTIPLE.**

YURI FREDESVINDO HERNANDEZ PAREDES

Tesis

Presentada ante las autoridades de la
Escuela de Estudios de Postgrado de la
Facultad de Ciencias Médicas
Maestría en Ciencias para obtener el grado de
Maestro en Cirugía Oncológica

Febrero 2012



ESCUELA DE
ESTUDIOS DE
POSTGRADO

Facultad de Ciencias Médicas Universidad de San Carlos de Guatemala

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

HACE CONSTAR QUE:

El Doctor: Yuri Fredesvindo Hernández Paredes

Carné Universitario No.: 1004202

Ha presentado, para su EXAMEN PÚBLICO DE TESIS, previo a otorgar el grado de Maestro en Cirugía Oncológica, el trabajo de tesis **"Detección y tipificación de virus del papiloma humano en pacientes con diagnóstico de cáncer cervicouterino en el Instituto de Cancerología (INCAN) de Guatemala por medio de PCR anidado múltiple"**

Que fue asesorado: Dr. Eduardo Gharzouzi

Y revisado por: Dr. Carlos Enrique Sánchez Rodas

Quienes lo avalan y han firmado conformes, por lo que se emite, la ORDEN DE IMPRESIÓN para febrero 2012.

Guatemala, 14 de febrero de 2012

Dr. Carlos Humberto Vargas Reyes MSc.

Director
Escuela de Estudios de Postgrado

Dr. Luis Alfredo Ruiz Cruz MSc.

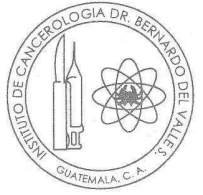
Coordinador General
Programa de Maestrías y Especialidades

/lamo



Instituto de Cancerología y Hospital "Dr. Bernardo del Valle S."

6a. Ave. 6-58, Zona 11 • 01011 Guatemala, C. A.
PBX: 2417-2100 • DIRECCION: Telefax: 2471-3136



Guatemala, 12 de Enero de 2012

Doctor
Luis Alfredo Ruiz Cruz
Coordinador General
Programas de Maestrías y Especialidades


Estimado Dr. Ruiz:

Reciba un caluroso saludo deseándole éxitos en sus actividades cotidianas.

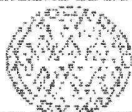
El motivo de la presente es informarle que, como **asesor** del Dr. Yuri Hernández, y su trabajo de tesis "**Detección y Tipificación de Virus del Papiloma Humano en pacientes con diagnóstico de Cáncer Cervico Uterino en el INCAN, por medio de PCR Anidado Múltiple**" el Dr. Hernández cumplió con todos los requisitos del estudio de investigación y aprobó su respectivo examen con terna evaluadora cuya acta ya fue enviada a su despacho. Debido a que yo soy el **ASESOR** del trabajo del Dr. Hernández, le dirijo a usted esta información que es requisito para impresión de informe final de tesis.

Sin mas por el momento y agradeciendo la atención a la presente me suscribo.

Atentamente,


Dr. Eduardo Gharzouzi
Coordinador Maestría
Cirugía Oncológica
INCAN

INSTITUTO DE CANCEROLOGIA
DEPARTAMENTO DE DOCENCIA
Guatemala, C. A.



Oficio CGP.EEP/HR/080/2011
Guatemala, 05 de agosto de 2011

Doctor
Luis Alfredo Ruiz Cruz
COORDINADOR GENERAL
Programas de Maestrías y Especialidades
Presente

Estimado Doctor Ruiz:

Atentamente me dirijo a usted deseándole éxitos en sus labores cotidianas, el motivo de la presente es para informarle que he revisado el trabajo de tesis titulada: "Detección y tipificación de virus del papiloma humano en pacientes con diagnóstico de cáncer Cerviño uterino en el instituto de cancerológica (INCAN), Guatemala. Por medio de PCR-ANIDADO múltiple". Realizada por el Doctor Yuri Hernández Paredes, del Instituto de Cancerología INCAN, el cual ha cumplido con todas las requerimientos para su aval por esta coordinación pudiendo continuar con los tramites correspondientes para impresión de tesis y tramite de graduación.

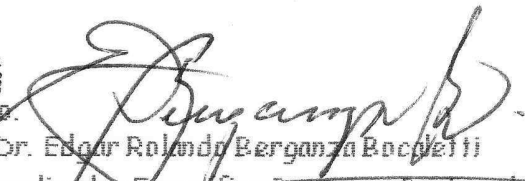
Sin otro particular por el momento me suscribo de usted.

Atentamente,


Dr. Carlos Enrique Sánchez Rodas
Docente Programa Postgrado Pediatría
Universidad de San Carlos de Guatemala
Hospital Roosevelt

c.c. Archivo
CESR-ERBB/evelyn



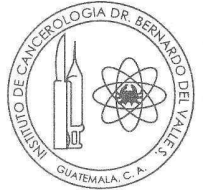

Dr. Edgar Rolando Berganza Bocchetti
Coordinador Especifico Programa Postgrado
Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Médicas
Hospital Roosevelt



Instituto de Cancerología y Hospital "Dr. Bernardo del Valle S."

6a. Ave. 6-58, Zona 11 • 01011 Guatemala, C. A.

PBX: 2417-2100 DIRECCION MEDICA Telefax: 2471-3136 www.ligacancerquate.org



Guatemala, 17 de Agosto de 2011

Doctor
Luis Alfredo Ruiz Cruz
Coordinador General
Programas de Maestrías y Especialidades
Presente

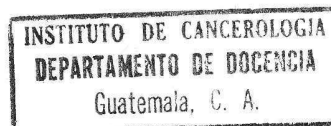
Estimado Dr. Ruiz:

Atentamente me dirijo a usted deseándole éxitos en sus labores cotidianas. El motivo de la presente es para informarle que he revisado el trabajo de tesis titulada **"Detección y tipificación de virus del papiloma humano en pacientes con diagnóstico de cáncer cervico uterino en el Instituto de Cancerología (INCAN), Guatemala, por medio de PCR-ANIDADO múltiple"** del Dr. Yuri Hernández Paredes, el cual queda aceptado por esta jefatura de Docencia como trabajo de investigación final.

Por parte del Departamento de Docencia del INCAN solicitamos se le permita al Dr. Yuri Hernández continuar con los trámites necesarios para la impresión de tesis y proceso de graduación.

Sin otro particular por el momento me suscribo de usted.

Dr. Roilan Gómez Aceytuno
Coordinador Departamento de Docencia
INCAN



“In principio erat Verbum, et Verbum erat apud Deum, et Deus erat Verbum.... Omnia per ipsum facta sunt; et sine ipso factum est nihil, quod factum est.” Jn. 1 y 3

En el principio era el Verbo, y el Verbo era con Dios y el Verbo era Dios..... Todas las cosas fueron hechas por El; y nada de lo que fue hecho se hizo sin Él. Jn. 1 y 3

Dedicado a las personas más importantes de mi vida:

Iris Aracely, Aracely del Rosario, Iris Maryflor, Heidy Isabel, María del Carmen, Agualuz , Fredesvindo, Braulio, Jorge y Amparo.

INDICE DE CONTENIDOS

| | | |
|-------|---|----|
| I. | RESUMEN | 1 |
| II. | INTRODUCCION | 2 |
| III. | ANTECEDENTES | 6 |
| | 3.1 EPIDEMIOLOGIA | 6 |
| | 3.2 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO | 13 |
| | 3.3 TIPIFICACION DE VPH | 17 |
| | 3.4 VACUNAS CONTRA VPH | 22 |
| IV. | OBJETIVOS | 24 |
| V. | MATERIALES Y METODOS | 25 |
| VI. | RESULTADOS, DISCUSION Y ANALISIS | 32 |
| | 6.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE LA MUESTRA | 32 |
| | 6.2 RESULTADOS DE LA TIPIFICACION DE VPH | 34 |
| | 6.3 CONCLUSIONES | 38 |
| | 6.4 RECOMENDACIONES | 39 |
| VII. | REFERENCIAS BIBLOGRAFICAS | 40 |
| VIII. | ANEXOS | 43 |

**DETECCION Y TIPIFICACION DE VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN PACIENTES
CON DIAGNOSTICO DE CANCER CERVICO UTERINO EN EL INSTITUTO DE
CANCEROLOGIA (INCAN) DE GUATEMALA POR MEDIO DE PCR ANIDADO MULTIPLE**

RESUMEN:

A nivel mundial el cáncer de cérvix ocupa la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en las mujeres. Se acepta actualmente el papel del Virus del papiloma Humano (VPH) en la carcinogénesis del Cáncer Cérvico Uterino como el factor desencadenante del mismo. El VPH genital se clasifica en 2 diferentes grupos, denominados de alto y bajo riesgo, según su potencial oncogénico. Se ha propuesto la vacunación contra VPH como una medida para la prevención del desarrollo de Cáncer Cérvico Uterino asociada a programas de screening mediante citologías.

En el presente estudio se detectó la presencia del VPH en lesiones neoplásicas invasivas en el cérvix uterino a través de Reacción de Cadena de la Polimerasa Anidado Múltiple (PCR Nested Múltiple).

Este estudio es de tipo descriptivo y fue realizado en pacientes que fueron atendidas en las clínicas de consulta externa del INCAN (Instituto de Cancerología) de Guatemala, en el periodo comprendido entre Enero del 2009 a Febrero del 2011. Se incluyó a un total de 30 pacientes, seleccionadas al azar, con diagnóstico histopatológico, por biopsia, de Carcinoma Cérvico Uterino. El 100% de las muestras estudiadas presentaron ADN viral de algún tipo de VPH de alto riesgo, siendo los genotipos 16 y 18 los asociados a la gran mayoría de lesiones malignas estudiadas (79.99%). El tipo histológico predominante fue el Carcinoma Epidermoide en un 80%. Se encontraron coinfecciones en 30% de las muestras y en todos estos casos la asociación fue de 2 virus de alto riesgo, no se encontró ninguna coinfección entre VPH de alto y bajo grado, en todas las pacientes con coinfecciones estuvo presente VPH 16 asociado a otro virus.

Coincidimos con investigadores de otros países al afirmar que básicamente el carcinoma Cérvico Uterino se comporta como una enfermedad de transmisión sexual. La utilización de vacunas preventivas en nuestro país podría ser recomendada como una política de Salud Pública para el control del Cáncer Cervical, ya que en basados a los resultados de este estudio, proporcionaría prevención contra los 2 tipos de virus más frecuentemente asociados, en nuestro medio, al apareamiento de Cáncer Cérvico Uterino.

II. INTRODUCCIÓN:

El cáncer de cérvix es un problema de salud pública en países en subdesarrollo. Se estima que cada año se diagnostican 500,000 casos nuevos en el mundo, siendo responsable de 260,000 muertes anuales a nivel mundial. En concordancia, la Organización Panamericana de la Salud –OPS- estima que el 80% de los casos de cáncer cervical se encuentran en países en vías de desarrollo, y que en América Latina se producen de 5 a 6 muertes por cada 100,000 mujeres secundarias a Cáncer Cervical. (1, 2)

Se ha reportado que la incidencia del cáncer de cérvix en los países de América Latina varía de acuerdo al país, nivel socioeconómico, procedencia urbana o rural; ocupando Guatemala el décimo lugar de incidencia por 100,000 habitantes. En forma global la incidencia es mayor en los países de Centroamérica con una incidencia en promedio de 51 casos por 100,000 habitantes (1).

Los estudios sobre la epidemiología del cáncer de cérvix han demostrado que esta entidad se comporta como una enfermedad de transmisión sexual, y diversos factores de riesgo parecen estar involucrados en su desarrollo tales como tabaquismo, edad temprana en el inicio de relaciones sexuales, número de parejas, infecciones bacterianas, etc. Sin embargo, múltiples estudios han concluido que el factor primordial y definitivo en la etiología del cáncer de cérvix es la infección por algunos tipos de virus del papiloma humano. (2)

En la actualidad se reconocen más de 100 tipos diferentes de VPH los que se clasifican de acuerdo con las homologías en su material genético. El VPH puede infectar epitelios y mucosas del ser humano. La familia del VPH genital es la responsable tanto de la condilomatosis como del desarrollo de Carcinoma Cérvico Uterino. Estudios a nivel mundial han reportado la presencia del material genético del virus (ADN) en los casos de cáncer de cérvix de origen epitelial. En los últimos años con el mejoramiento de las técnicas de biología molecular se ha logrado una mayor sensibilidad de las mismas y la detección del ADN viral se ha optimizado hasta tener el 99.7% de positividad al VPH en los pacientes con Carcinoma Cérvico Uterino. (3)

Algunos estudios extranjeros han determinado 19 serotipos virales de los 100 conocidos a la fecha, asociados a lesiones genitales, clasificando como de alto riesgo a los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68, denominados así debido a su alto potencial de transformar las células epiteliales cervicales en malignas; y los de bajo riesgo a los tipos 6, 11, 42, 43, y 44 asociados principalmente a lesiones verrucosas genitales. Actualmente se conoce que las lesiones de bajo y alto grado intraepiteliales cervicales son precursoras de cáncer invasor cervical y se ha determinado la presencia de Virus del Papiloma Humano (VPH) en 60-90 % de dichas lesiones. (2).

Es un hecho aceptado la asociación existente entre la infección por el Virus del Papiloma Humano y el desarrollo posterior de Carcinoma Cérvico Uterino, sobre todo con las especies clasificadas como de alto riesgo oncológico. La mecánica de la transmisión de la infección por VPH hace que sea necesario el contacto directo, piel con piel o mucosa con mucosa para poder transmitir el virus de un individuo a otro. A nivel mundial se ha establecido que los genotipos 16 y 18 del VPH son los que se encuentran con mayor frecuencia asociados al desarrollo de lesiones tanto pre-malignas como a neoplasias del Cérvix Uterino, sobre todo en los países del Hemisferio Occidental. Existen algunas variantes geográficas, en cuanto a la prevalencia de los diferentes genotipos y su asociación con el desarrollo de Cáncer Cervical. Estas se hacen más marcadas en regiones como el Lejano Oriente donde el VPH 18 es más frecuente que el 16, o algunas comunidades de Alemania Occidental donde VPH 31 y 53 son más frecuentes que el 18, y en países como Corea donde las infecciones por VPH 18 son poco frecuentes no así la asociación de los tipos 51, 52 y 58 con Cáncer Cérvico Uterino.

En dos centros de toma del Papanicolaou en Guatemala, INCAN y APROFAM, se reporta aproximadamente en el 5 % de los casos algún tipo de lesión intraepitelial cervical de bajo y de alto grado; de estos casos en el 30% se evidencia la presencia del VPH debido a las imágenes patológicas denominadas coilocitosis, sin embargo el estudio anatomopatológico tiene una limitada sensibilidad al diagnóstico de VPH y no puede tipificarlo.

En este estudio para detectar VPH se utilizó el método denominado Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR, por sus siglas en inglés. La variante utilizada de PCR fue el PCR Anidado Múltiple; en el cual en grupos de 4 se realiza cocteles o mezclas de 4 a 6 pares de primers, simultáneamente o sea en la misma Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), específicos para los VPH distintos, este método detecta el material genético viral

amplificando las secuencias de su ADN. A cada muestra se le practicó un PCR de control de calidad, detectando el gen de la β Globina, para establecer la viabilidad del ADN en la muestra, se estableció como nivel adecuado una concentración mayor a 35 ng/ul. Posteriormente se realizó un PCR con primers universales para las regiones L1 del VPH, detectando el MY09/11. La positividad al MY09/11 evidenciaba la presencia de material genético de VPH en las muestras estudiadas. En todas aquellas muestras positivas para ADN de VPH se determinó la presencia de los 19 diferentes tipos de los virus del papiloma Humano genitales con primers específicos.

Las muestras fueron obtenidas de pacientes que acudieron a la consulta externa del INCAN con diagnóstico de cáncer Cérvico Uterino invasivo de diversos tipos histopatológicos epidermoide, adenocarcinoma o mixto adeno-escamoso.

Mediante pinza de biopsia y bajo visión directa de la lesión durante el examen ginecológico se tomó una muestra de tejido para determinar la prevalencia de los VPH riesgo según el tipo de Lesión Invasiva del Cérvix. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de San Carlos de Guatemala, Centro Universitario Metropolitano (CUM).

El análisis del ADN de las muestras del presente estudio, reveló la presencia de material genético viral de VPH en las mismas determinando la frecuencia de los diferentes tipos virales en las muestras positivas. En nuestro estudio la totalidad de los pacientes (100%) fue positiva para ADN viral de VPH, en todos los casos asociándose a un tipo clasificado como de alto riesgo.

En diversos países han investigado la presencia del VPH y los serotipos de alto riesgo asociados a Cáncer Cérvico Uterino, pudiendo iniciar diversas medidas preventivas como por ejemplo, aplicar la vacuna bivalente o tetravalente dependiendo de la frecuencia de los virus en cada país o zona geográfica específica. Los estudios en cada región geográfica de las variantes intratipo, son importantes para establecer una base de datos sobre la diversidad y patogenicidad de distintas especies, tipos y variantes de VPH, que ayude al diseño y optimización de protocolos de tratamiento y vacunación. Se hacía indispensable conocer la asociación de los genotipos de VPH y Cáncer de Cérvix en Guatemala y así brindar al clínico una base para recomendar o no la vacunación como parte de la prevención del Cáncer Cervical.

El desarrollo de vacunas hace posible que mediante las mismas se pueda prevenir la infección por VPH y en consecuencia evitar el posterior desarrollo de Cáncer Cérvico Uterino. Las vacunas existentes brindan protección únicamente contra 2 de los virus de alto riesgo el 16 y el 18. No se contaba con estudios en el país que indicaran la epidemiología de las infecciones por VPH así como su asociación a Cáncer Cérvico Uterino. Los resultados del presente estudio demuestran que al ser los 2 tipos de VPH asociados a Cáncer Cérvico Uterino el 16 y el 18, la aplicación de la Vacuna contra los mismos podría ser de utilidad como medida de Salud Pública para disminuir la incidencia de esta entidad.

III. ANTECEDENTES

3.1 EPIDEMIOLOGIA

El Cáncer Cérvico Uterino afecta desproporcionalmente más a los países más pobres, y dentro de estos países a las comunidades más pobres; principalmente debido a la debilidad de los sistemas de salud gubernamentales y de los programas de prevención (4)

Según Informe de la OMS para el año 2000 se registró una incidencia de 470,606 casos nuevos, y 233,372 muertes atribuibles al Cáncer Cervicouterino alrededor de todo el mundo. Más del 80% de estas muertes son aportadas por países en vías de desarrollo, en los cuales el Cáncer Cervical Uterino es la neoplasia más frecuente. (5, 6)

En América, se estima que 92,136 nuevos casos y 37,640 muertes atribuibles a Cáncer Cervical Uterino se presentan anualmente, siendo el Cáncer de Cérvix el causante de 83.9% de las muertes atribuibles al Cáncer en América Latina. (7)

En Guatemala existe un gran subregistro de las estadísticas sobre enfermedades crónicas, incluyendo el Cáncer, ya que estas no son de reporte obligatorio, sin embargo por el esfuerzo del Registro del Cáncer de Guatemala (RECANGUA) se tiene una idea aproximada sobre la incidencia de Cáncer en nuestro país.

Según este registro se ha determinado que el cáncer en los genitales femeninos es la primera causa de hospitalización, así como la tercera causa de muerte secundaria a cáncer. El cáncer de cérvix tiene el 30.6% de ingresos al Instituto de Cancerología durante el año 2008, y según registros de las Municipalidades del departamento de Guatemala y el RECANGUA se le atribuye un 8.2% de todos los casos de muertes secundarias a enfermedades Malignas en el periodo comprendido entre los años 1995 a 1997. (Cuadro No. 1). (8)

| |
|--------------------|
| Cuadro No 1 |
|--------------------|

**LOCALIZACIONES MÁS FRECUENTES DE CÁNCER EN DEFUNCIONES
REGISTRADAS EN EL DEPARTAMENTO DE GUATEMALA, SEGÚN CIE-10*.
PERÍODO DE LOS AÑOS 1995 A 1997. MUJERES**

| LUGAR | CIE-10 | DESCRIPCIÓN | NÚMERO | % |
|------------------------|--------|---------------------------------------|-------------|--------------|
| TOTAL (C00-C96) | | | 2296 | 100.0 |
| 1 | C16 | Estómago | 362 | 15.8 |
| 2 | C22 | Hígado y Vías Biliares Intrahepáticas | 309 | 13.5 |
| 3 | C80 | Sitios Primarios No Especificados | 284 | 12.4 |
| 4 | C53 | Cuello del Útero | 189 | 8.2 |
| 5 | C50 | Glándula Mamaria | 168 | 7.3 |
| 6 | C55 | Útero, SAI** | 122 | 5.3 |
| 7 | C34 | Bronquios y Pulmón | 118 | 5.1 |
| 8 | C25 | Páncreas | 85 | 3.7 |
| 9 | C56 | Ovario | 68 | 3.0 |
| 10 | C18 | Colon | 62 | 2.7 |
| | | Resto de Neoplasias | 529 | 23.0 |

* Clasificación Internacional de Enfermedades, 10 edición

** Sin Adicional Información

FUENTE: Registros Civiles de las Municipalidades del Departamento de Guatemala

ELABORACIÓN: Registro Nacional de Cáncer

Los datos reportados por el Instituto de Cancerología (INCAN), en el año 2,008 colocan al Cáncer Cérvico Uterino (CaCu) como la más frecuente de todas las neoplasias, en las mujeres, según su localización. Con un 39.1 % del total de casos de Cáncer reportados en mujeres, correspondiendo un 34.20% a CaCu invasor y un 4.9% a CaCu in situ, el cual se ha demostrado que es un estadio previo al cáncer invasivo. (Cuadro No 2) En las unidades de Colposcopia se atienden pacientes con lesiones del cérvix pre-invasivas e invasivas diagnosticadas por histopatología. En el INCAN fueron diagnosticados en el año 2006: Lesiones intraepiteliales de bajo grado (LEIBG) 60 casos, Lesiones intraepiteliales de alto grado (LEIAG) 109 casos, Cáncer Invasivo tipo epidermoide 31 casos, adenocarcinoma 4 y Mixto 1 caso. (8)

Cuadro No 2

**REGISTRO HOSPITALARIO DEL INCAN - GUATEMALA.
LOCALIZACIONES MAS FRECUENTES (CIE-10) REGISTRADAS
EN SEXO FEMENINO DURANTE EL AÑO 2008.**

| LUGAR | CIE-10 | | Número | % |
|------------------|--------|----------------------------------|--------------|---------------|
| | CODIGO | DESCRIPCION | | |
| 1 | C53 | Cérvix | 708 | 34.2 |
| | D06 | Carcinoma In Situ Cérvix | 101 | 4.9 |
| 2 | C50 | Mama | 345 | 16.7 |
| 3 | C44 | Otros Tumores de la Piel | 128 | 6.2 |
| 4 | C56 | Ovario | 80 | 3.9 |
| 5 | C16 | Estómago | 68 | 3.3 |
| 6 | C80 | Sitio Primario Desconocido | 56 | 2.7 |
| 7 | C54 | Cuerpo Del Utero | 51 | 2.5 |
| 8 | C73 | Tiroides | 49 | 2.4 |
| 9 | C22 | Hígado y Vías Biliares Intrahep. | 35 | 1.7 |
| 10 | C23 | Vesícula Biliar | 26 | 1.3 |
| | | Resto de Localizaciones | 421 | 20.4 |
| C00 - D09 | | TODAS LAS LOCALIZACIONES | 2,068 | 100.0% |

FUENTE: Registro de Cáncer del INCAN - Guatemala.

Esta tendencia se ha mantenido invariable en los últimos 10 años, según el reporte de la misma institución, donde el Cáncer cervicouterino ha prevalecido como la neoplasia más frecuente en mujeres según se muestra en el cuadro No 3 (8)

CUADRO No. 3

**TENDENCIAS DE LAS LOCALIZACIONES MAS FRECUENTES DE LOS AÑOS 1999 A
2008 EN EL SEXO FEMENINO.**

| LUGAR | CIE-10 | | AÑOS | | | | | | | | | | |
|-------|--------|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| | CODIGO | DESCRIPCION | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | TOTAL |
| 1 | C53 | Cérvix | 700 | 700 | 717 | 747 | 707 | 713 | 748 | 735 | 783 | 708 | 7,258 |
| | D06 | Carcinoma In Situ Cérvix | 154 | 98 | 129 | 106 | 122 | 140 | 144 | 122 | 115 | 101 | 1,231 |
| 2 | C50 | Mama | 201 | 221 | 207 | 245 | 257 | 252 | 282 | 299 | 318 | 345 | 2,627 |
| 3 | C44 | Otros Tumores de la Piel | 80 | 96 | 98 | 103 | 128 | 127 | 135 | 107 | 130 | 128 | 1,132 |
| 4 | C56 | Ovario | 41 | 54 | 56 | 61 | 60 | 60 | 58 | 56 | 69 | 80 | 595 |
| 5 | C16 | Estómago | 36 | 36 | 26 | 53 | 52 | 59 | 54 | 62 | 68 | 68 | 514 |

FUENTE: Registro de Cáncer del INCAN - Guatemala.

El Cáncer de Cérvix es la neoplasia con el mayor potencial de prevención secundaria demostrado. Esta enfermedad es totalmente curable y prevenible, a bajo costo y con un bajo riesgo, cuando son implementados programas de screening en pacientes asintomáticas junto a programas de diagnóstico y tratamiento adecuados. En América Latina los programas de screening, han tenido un impacto limitado o nulo, debido a su pobre implementación en el área. (5, 6, 7)

En México, donde existen programas de screening desde hace más de 20 años, menos del 13% de los casos prevenibles ha sido detectado, situación similar se da en Costa Rica donde no ha habido ningún impacto en las tasas de incidencia ni mortalidad, atribuibles al Cáncer Cervical a pesar de programas de screening implementados desde 1960. Cuando se calculan los años de vida ajustados por discapacidad, DALY (por sus siglas en Inglés:

Disability adjusted life year), se estima que en América Latina el Cáncer Cérvico Uterino causa la pérdida de 471,000 DALY. Un DALY es el valor actual de los futuros años de vida libres de incapacidad, que se pierden o se ganan a causa de muerte prematura o de incapacidad en un año determinado. El cuadro numero 4 presenta las tasas de incidencia y mortalidad de los países de América debidos a Cáncer Cérvico Uterino ajustadas por edad y expresadas sobre 100,000 mujeres. (5)

Cuadro No. 4

CANCER DE CERVIX EN AMERICA

DISTRIBUCION POR PAIS INCIDENCIA Y MORTALIDAD SEGÚNOMS, TASAS ESTANDARIZADOS POREDADE POR 100,000 HABITANTES (5,7)

| País | Incidencia | Muertes | Tasa de Incidencia | Tasa de Mortalidad |
|-----------------|------------|---------|--------------------|--------------------|
| Argentina | 2953 | 1585 | 14.2 | 7.6 |
| Bahamas | 31 | 13 | 22.1 | 9.3 |
| Barbados | 54 | 27 | 30.4 | 13.6 |
| Belice | 30 | 11 | 39.6 | 16.8 |
| Bolivia | 1807 | 661 | 58.1 | 22.2 |
| Brasil | 24445 | 8815 | 31.3 | 11.6 |
| Canadá | 1608 | 650 | 8.2 | 2.8 |
| Chile | 2321 | 860 | 29.2 | 10.6 |
| Colombia | 5901 | 2339 | 32.9 | 13.7 |
| Costa Rica | 424 | 197 | 25.0 | 12.1 |
| Cuba | 1586 | 730 | 23.8 | 10.6 |
| Rep. Dominicana | 1290 | 495 | 38.4 | 15.8 |
| Ecuador | 2231 | 892 | 44.2 | 18.6 |
| El Salvador | 1041 | 387 | 40.6 | 15.8 |
| Guatemala | 1432 | 566 | 39.6 | 16.8 |
| Guyana | 184 | 69 | 51.1 | 20.6 |

| | | | | |
|-------------------|-------|------|------|------|
| Haití | 2428 | 1326 | 93.9 | 53.5 |
| Honduras | 833 | 329 | 39.6 | 16.8 |
| Jamaica | 489 | 209 | 43.4 | 18.4 |
| México | 16448 | 6650 | 40.5 | 17.1 |
| Nicaragua | 997 | 392 | 61.1 | 26.1 |
| Panamá | 389 | 158 | 31.2 | 13.1 |
| Paraguay | 768 | 281 | 41.1 | 15.8 |
| Perú | 4101 | 1575 | 39.9 | 15.8 |
| Puerto Rico | 252 | 114 | 10.3 | 4.3 |
| Suriname | 77 | 31 | 43.8 | 18.2 |
| Trinidad y Tobago | 215 | 97 | 33.3 | 15.0 |
| Estados Unidos | 13230 | 6417 | 7.8 | 3.3 |
| Uruguay | 307 | 163 | 13.8 | 7.6 |
| Venezuela | 3904 | 1454 | 38.3 | 15.2 |

Latinoamérica y el Caribe tienen uno de los más altos índices de incidencia y mortalidad debidos a Cáncer Cervical en el mundo, únicamente superados por África Occidental y Melanesia.

Cuadro No. 5

TASAS DE INCIDENCIA Y MORTALIDAD MUNDIAL POR CANCER CERVICOUTERINO
SEGÚN REGION (5)

| Region | Tasa de Incidencia | Tasa de Mortalidad |
|-----------------|--------------------|--------------------|
| África | 44.32 | 24.24 |
| Melanesia | 43.81 | 23.78 |
| América Central | 40.28 | 17.03 |
| Caribe | 35.78 | 16.84 |
| Sur América | 30.92 | 11.97 |
| Norte América | 7.88 | 3.23 |

En los últimos 40 años las tasas de incidencia de Cáncer Cérvico Uterino han disminuido notablemente en países como Canadá y Usa hasta menos de 10 casos por 100,000 mujeres; sin embargo en la mayoría de países de Latinoamérica la incidencia se mantiene por arriba de 20 casos por 100,000. Pocos países en la región han reportado disminuciones significativas en la mortalidad por Cáncer cervical en el periodo de 1968 a 1993 según informes de OMS y la OPS. Es más en la subregión del Caribe se ha sugerido que la mortalidad por Cáncer cervical se ha mantenido por arriba de 25 muertes por 100,000 en comparación con países como Canadá donde en el año 2000 se reportó una tasa de mortalidad por Cáncer cervical de 1.17 por 100,000 mujeres. (5, 6)

La mortalidad por Cáncer Cérvico Uterino es 7 veces mayor en Latino América y el Caribe que en Norte América. Por regiones los países más afectados son los de Centro América y el Caribe, y en forma individual los países con tasas de mortalidad más elevadas son Haití, Bolivia, Paraguay Perú y Nicaragua (4)

El impacto de estas cifras sobre el desarrollo socioeconómico de los países afectados es muy considerable, además las perdidas, en vidas humanas son alarmantes. Se calcula que las muertes por cáncer cervical en América causa la pérdida de un gran número de años de vida en la región; en el año 1995; 6,065 mujeres comprendidas entre los 35 y 64 años de edad murieron por Cáncer Cervical en 16 de los países Latino Americanos con más incidencia de Cáncer Cervical, asumiendo que en promedio en estos países la esperanza de vida es de 75.8 años la pérdida de potencial de años de vida fue de 183,487 años. Según los últimos datos de la OPS entre 1996 y 2001 murieron en los 13 países con más incidencia de Cáncer cervical en América Latina 74,855 mujeres, de ellas 50,032 estaban comprendidas entre los 25 y 64 años de edad, lo que causo una pérdida de potencial de años de vida de 1.56 millones de años. Esto se traduce en pérdida de años productivos, lo que tiende a empobrecer más la región, representando una perdida en productividad de aproximadamente 3.3 billones de US\$. (4,5,6,7)

Las variaciones en la incidencia y la mortalidad causadas por Cáncer Cérvico Uterino se ven influenciadas por varios factores: diferencias en la posibilidad de acceso y en la calidad de los servicios de salud, localización geográfica, estatus socio económico, educación y factores psicológicos y sociales. Tradicionalmente se ha aceptado que en los estratos socio

económicos bajos la incidencia de casos de Cáncer Cervical es mayor, así como la frecuencia de detección de casos más avanzados. (5,6,7)

3.2 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El Cáncer Cervical representa una de las pocas neoplasias en las cuales un agente etiológico específico ha sido identificado. La habilidad para la realización de programas de screening y para el diagnóstico de mujeres con infecciones por Virus del papiloma humano de los tipos de alto riesgo que puedan presentar infecciones persistentes por dichos virus, podría facilitar el seguimiento de aquellas mujeres que podrían desarrollar Cáncer Cérico Uterino, aun en presencia de citologías de Cérnix negativas. (9,10,11)

Existe evidencia a nivel mundial que confirma que algunos tipos genéticos del virus del papiloma humano (HPV) juegan un papel necesario en la carcinogénesis del cuello uterino. La infección por virus del papiloma humano es actualmente la enfermedad de transmisión sexual más frecuente en el mundo, se estima que 5.5 millones de personas en Estados Unidos serán infectadas anualmente y que más de 20 millones de estadounidenses se encuentra infectados actualmente. El riesgo de infección por HPV durante la vida llega a ser tan alto como 80 a 85% para personas sexualmente activas. La infección aguda ocurre rápidamente después del inicio de la vida sexual activa y se mantiene con una alta prevalencia en mujeres en edad reproductiva. HPV infecta el epitelio genital por contacto directo piel a piel o mucosa a mucosa. (10)

Algunos tipos de HPV causan verrugas genitales, pero la mayoría de infecciones pueden cursar asintomáticas por lo que la transmisión puede ocurrir por ignorancia del status de portador asintomático. El factor de riesgo más importante para el contagio con HPV es el número de compañeros sexuales durante la vida y el inicio de actividad sexual durante edades tempranas de la adolescencia. (10, 11, 12)

Los Virus del Papiloma Humano son virus pequeños, no encapsulados, con doble cadena de ADN clasificados en el género papillomavirus de la familia Papiviridae. Este grupo de virus había sido originalmente clasificado junto con los poliomavirus en una sola familia. Esto se basaba en que comparten las mismas cápsides y que tiene en común el doble genoma

circular de ADN. Más tarde se reconoció que los dos grupos de virus tienen diferentes tamaños de genoma, organizaciones del genoma completamente diferentes, y muy pocas semejanzas en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos. Ahora son reconocidos oficialmente por el Comité Internacional sobre la Taxonomía de Virus (ICTV) como dos familias, Papillomaviridae y Polyomaviridae.

Existen más de 100 tipos distintos de HPV identificados en la actualidad y aproximadamente 19 de estos infectan la mucosa del tracto anogenital. (10,11,12)

Se debe tener en cuenta la falta de homología general entre los genomas virales de la familia Papoviridae. Sin embargo, para clasificarse dentro de la familia, debe identificarse una Helicasa de la proteína E1 PV, con una longitud de 230 aminoácidos; que tiene similitud con algunas secuencias del antígeno SV40 T; y la proteína NS1 parvovirus. La clasificación taxonómica tradicional de HPV acordada internacionalmente en el Taller Internacional del Virus del Papiloma celebrada en Quebec en 1995; está basada en la secuencia de nucleótidos en el gen L1 del genoma viral. Ha sido utilizada para la identificación de nuevos tipos de HPV en los últimos 15 años. Un nuevo HPV aislado es reconocido como tal si el genoma completo ha sido clonado y la secuencia de ADN del gen L1 difiere en más del 10% de los tipos más cercanos conocidos de Papiloma Virus. Las diferencias entre el 2% y el 10% de homología definen un subtipo y menos del 2% una variante de un HPV ya clasificado. Nuevos tipos de VPH han sido identificados desde la utilización de las técnicas de Reacción de Cadenas de Polimerasa (PCR).

La comparación de secuencias utilizando el gen L1 ha hecho posible clasificar a los miembros de la familia de HPV en 2 grandes grupos:

- 1) Agrupaciones de orden superior llamadas supergrupos ó ramas principales de VPH, por ejemplo, los VPH genitales.
- 2) Agrupaciones de tipos de VPH llamados "subgrupos", o ramas menores, por ejemplo, el VPH-6, 11, 44,55. (13)

A partir de esta clasificación se han utilizado los términos: Género para agrupar las ramas principales y Especie para las ramas menores. Las diferentes especies de VPH, suelen compartir características comunes tanto Biológicas como Patológicas. Así todos los tipos de VPH que forman una especie junto con el VPH-16 son llamados de "alto riesgo" ya que estos tipos de VPH se encuentra relacionados con el Cáncer Cervical y sus lesiones precursoras.

(11,12)

Los tipos VPH 16 y VPH 18 han sido ampliamente identificados como de alto riesgo en la histogénesis del Cáncer Cérvico Uterino, adicionalmente, estudios a nivel mundial han expandido la lista de virus oncogénicos para incluir los subtipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 56, 59,66 y 68. Globalmente, la prevalencia de HPV en carcinomas cervicales se encuentra alrededor del 99.7 %, y los subtipos 16 y 18 han sido los más frecuentemente implicados. VPH 16 es el más prevalente en todo el mundo, con excepción del Sureste de Asia donde VPH 18 es más frecuente. Se calcula que VPH 16 es responsable, por sí solo, de más del 50% de las infecciones por VPH, y que al menos 20% de las mujeres americanas se encuentran infectadas con este subtipo. VPH 16 y 18 son los subtipos más frecuentemente asociados a lesiones intraepiteliales de alto grado, mientras que los tipos de bajo riesgo: VPH 6, 11, 42, 43 y 44 se encuentran asociados a condilomatosis y lesiones cervicales de bajo grado, presentando poco potencial oncogénico. (11,12)

En Latinoamérica según la OPS se considera que el 15.6% de las mujeres mayores de 15 años son positivas a VPH, países como Honduras, Costa Rica y Paraguay tienen las mayores incidencias de la región (4)

Después de una infección por HPV de una especie de alto riesgo, dado que los virus del papiloma humano, no codifican las enzimas necesarias para su propia replicación; estos desarrollan estrategias para asegurar su ingreso a las células de la capa supra basal del epitelio cervical; estas células siguen su ciclo de maduración y proporcionan un entorno que es permisivo para la replicación viral. El ADN del HPV se incorpora a sí mismo en el genoma de la célula huésped a través de la activación de oncogenes y la supresión de la respuesta inmune celular interfiriendo en los puntos de control del ciclo celular, que normalmente vigilan la fidelidad de la replicación y la segregación de los cromosomas. Las proteínas del HPV bloquean la capacidad de la célula de reparar los daños producidos a su propio genoma, además como consecuencia de estos cambios bloquea la apoptosis celular, esto causa alteraciones en la morfología celular que corresponden a los hallazgos de las citologías de cérvix de pacientes con HPV. En resumen, tres oncogenes, E5, E6 y E7, modulan el proceso de transformación, dos proteínas reguladoras, E1 y E2, modula la transcripción y replicación, y dos proteínas estructurales, L1 y L2, componen la cápside viral; E1, E2, L1 y L2 están especialmente bien conservados entre todos los miembros de la familia. La mayoría de las variantes son elementos que responden a la región larga del control (LCR) entre L1 y E6,

un segmento con poca secuencia de conservación. Las interacciones entre proteínas de la cápside y su receptor celular (S) no están claras, aunque los anticuerpos dirigidos principalmente contra las proteínas L1 y L2, puede bloquear la infección por HPV.

Varios estudios han demostrado que prácticamente todos los cánceres cérvico-uterinos pueden seguir expresando genes virales E6 y E7; y formar oncoproteínas manteniendo así la neoplasia. A nivel del genoma de los Cánceres cérvico uterinos existe una constelación de alteraciones genéticas sumadas a los genes del VPH que promueven la invasión, metástasis y la angiogénesis. Además, con frecuencia el cáncer cervical presenta una disminución en la expresión superficial de moléculas HLA clase I, lo que le proporciona un mecanismo para evasión inmunológica. (2)

El periodo de latencia entre la infección inicial de HPV y el desarrollo de Cáncer Cervical puede ser de meses a años. Aunque la progresión rápida es posible, el promedio de tiempo desde la infección inicial hasta la manifestación de un Cáncer Cervical invasivo se calcula en alrededor de 15 años. Las infecciones por HPV en adolescentes tienden a ser breves con un alto índice de regresión, mientras que en mujeres mayores tienden a persistir y volverse crónicas, este comportamiento no está muy bien entendido pero suele atribuirse a cambios en la respuesta inmune y hormonal en las mujeres mayores que impiden la eliminación espontánea del virus. (14,15,16)

Numerosos estudios han confirmado la presencia de HPV 16 y 18 en muestras de cáncer cervical de pacientes Latino Americanas y del Caribe. Adicionalmente existen algunas variantes de HPV que se asocian más con neoplasias invasivas o comportamientos biológicos más agresivos; así las variantes Asiático-Americanas de HPV se comportan de forma más agresiva que los mismos serotipos pero de variantes europeas. Aproximadamente el 25 de los casos de Cáncer Cérvico Uterino en México, son atribuibles a la variante Asiático Americana de HPV 16, mientras que en un estudio realizado en Guanacaste, Costa Rica, las mujeres infectadas con variantes no europeas de HPV 16 fueron diagnosticadas con Carcinomas de Cérvix 11 veces más frecuentemente que aquellas con subtipos Europeos de HPV 16. (14,15,16)

La tabla numero 6 muestra la incidencia de HPV 16 y 18 asociado a Cáncer Cérvico Uterino en algunos países de Latinoamérica. (7)

Cuadro No. 6

FRECUENCIA DE HPV ASOCIADO A CANCER CERVICAL EN LATINOAMERICA

| PAIS | PACIENTES CON CA CU Y HPV | % DE HPV POSITIVOS | % DE HPV16 | % DE HPV18 |
|-----------|---------------------------|--------------------|------------|------------|
| Argentina | 57 | 94.7 | 59.6 | 14.0 |
| Bolivia | 49 | 91.8 | 34.7 | 4.1 |
| Brasil | 46 | 87.0 | 52.2 | 8.7 |
| Chile | 80 | 92.5 | 45.0 | 5.0 |
| Colombia | 38 | 94.7 | 52.6 | 7.9 |
| Cuba | 45 | 93.3 | 57.8 | 6.7 |
| Panama | 73 | 93.3 | 46.6 | 15.1 |
| Paraguay | 117 | 94.0 | 54.7 | 11.1 |

Existen cofactores ambientales que asociados a HPV determinan el apareamiento de una neoplasia Cervical, entre estos tenemos agentes ambientales tales como el cigarrillo, anticonceptivos hormonales, dieta y otras infecciones asociadas a HPV. Estudios epidemiológicos bien fundamentados han encontrado que el consumo de tabaco asociado a HPV llega a aumentar el riesgo de Cáncer Cervical al doble de lo esperado, estudios adicionales han señalado que el uso de anticonceptivos orales por más de 10 años incrementa el riesgo de Ca de Cérnix. (16,17)

3.3 TIPIFICACION DE VPH

Siendo HPV el principal pre disponente al desarrollo de Cáncer de Cérnix existen esfuerzos destinados a desarrollar una prueba rápida, barata y de fácil aplicación para el tamizaje de pacientes con infecciones por HPV de alto riesgo.

Por otro lado se hacen estudios para tratar de determinar los marcadores biológicos que

puedan identificar a las pacientes con un alto riesgo de desarrollar lesiones intraepiteliales de alto grado. Es importante conocer y aplicar, con una metodología sensible y específica, la tipificación del VPH en áreas de alta prevalencia de Cáncer Cérvico Uterino en el mundo; ya que podrían servir como marcadores moleculares para establecer medidas preventivas, y curativas contra HPV, y por lo tanto disminuir la incidencia de Cáncer Cérvico Uterino. (2,16,17)

Diversas técnicas se utilizan para la detección de ADN de VPH, estas son:

- Métodos de sondas directas, tales como hibridación in situ,
- Métodos de amplificación de señal, tales como la captura híbrida 2 (HC2) , y
- Métodos de amplificación de objetivo, realizado por una variedad de PCR basado en técnicas de análisis de Genotipo, como: el análisis de secuencias de nucleótidos virales

Para la tipificación de HPV, ya sea en cepillados cervicales o en biopsias de cérvix; los métodos de más amplio uso por el momento son: el de Captura Híbrida, y el PCR. El método de Captura Híbrida consiste básicamente en detectar la presencia de material genético viral en las muestras de tejido obtenidas. Se basa en el conocimiento del genoma viral el cual se recombina con las diferentes bases complementarias de la doble cadena de ADN viral, formando híbridos de ADN con el material aportado por la prueba (Sintético) y el material obtenido de la muestra (ADN viral), estos híbridos son suspendidos en una matriz coloidal que contiene anticuerpos contra los híbridos específicos con los cuales reaccionan, posteriormente estos anticuerpos se unen a reactivos capaces de emitir luz por medio de inmunofluorescencia. (18,19)

La prueba de reacción de cadena de polimerasa (PCR) se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas. Inicialmente la técnica era lenta, ya que las polimerasas se desnaturalizaban al realizar los cambios de temperatura y era necesario agregar nuevas polimerasas en cada ciclo. Puesto que las temperaturas del ciclo (95 °C en las fases de desnaturalización del ADN) suponen la inmediata desnaturalización de toda proteína, se emplean ADN polimerasas termoestables, extraídas de microorganismos adaptados a vivir a esas temperaturas, restrictivas para la mayoría de los seres vivos. Dichos microorganismos,

generalmente arqueas, son: *Thermusaquaticus* (polimerasa Taq), *Pyrococcusfuriosus* (Pfu), *Thermococcuslitoralis* (Vent) y *Thermustermophilus* (Tth). Generalmente se emplean mezclas de polimerasas muy procesivas (Taq) con otras con corrección de errores (Pfu, Vent).

El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos; cada ciclo suele consistir en 2-3 pasos de temperaturas. La PCR común se realiza con ciclos que tienen tres pasos de temperatura. Los pasos de ciclos a menudo están precedidos por un choque térmico (llamado "hold") a alta temperatura (> 90°C), y seguido por otro hold al final del proceso para la extensión de producto final o el breve almacenaje. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros. Éstos incluyen la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de iones divalentes y dNTPs en la reacción, y la temperatura de unión de los cebadores. Los resultados de la PCR se analizan mediante técnicas de electroforesis, que separan los fragmentos de ADN generados de acuerdo a su carga, esto es, longitud, y, en menor medida y dependiendo de la matriz empleada, a su tamaño: típicamente se emplean la electroforesis en gel de agarosa, para fragmentos grandes; en acrilamida, para los más pequeños; y, de forma más rápida y aplicable a la PCR asociada a marcaje fluorescente, la electroforesis capilar. El tamaño de los productos de la PCR vienen determinados por un marcador de peso molecular de ADN, el cual contiene fragmentos de ADN de tamaño conocido, y que se corre en el gel junto con los productos de PCR. (2,18,19,20)

Después de la amplificación de PCR, las secuencias de VPH son detectados por inmunoensayo enzimático (EIA), y la posterior tipificación se realiza por la hibridación de la biotina con productos de PCR con el tipo específico de oligonucleótidos inmovilizados en membranas seguido de su detección utilizando una mayor reacción de quimioluminiscencia. Debido al formato de las líneas, los actuales ensayos están restringidos a un máximo de alrededor de 40 tipos de oligonucleótidos para la hibridación y la reacción depende de la lectura visual de la señal.

Actualmente se ha desarrollado un tipo especial de PCR, llamado de Anidación Múltiple (Nested Multiplex) que permite la detección simultánea y la tipificación genética de hasta 100 Tipos de VPH. Pudiendo inclusive evidenciar las coinfecciones del Virus del papiloma humano en una misma muestra. Además este método es de bajo costo y alta sensibilidad en comparación a otros (2,21)

Tradicionalmente se hace 1 PCR para cada tipo de virus, en PCR Nested Multiplex se realiza un PCR mezclando de 4 a 6 primers para detectar cualquiera de los virus estudiados. Al

correr los productos de PCR-Multiplex en 4 grupos llamados cocteles, ya que se mezclan de 4 a 6 pares de primers específicos, se puede ahorrar tiempo y reactivos sin dejar de ser específico y sensible.(21)

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, July 2004, p. 3176–3184

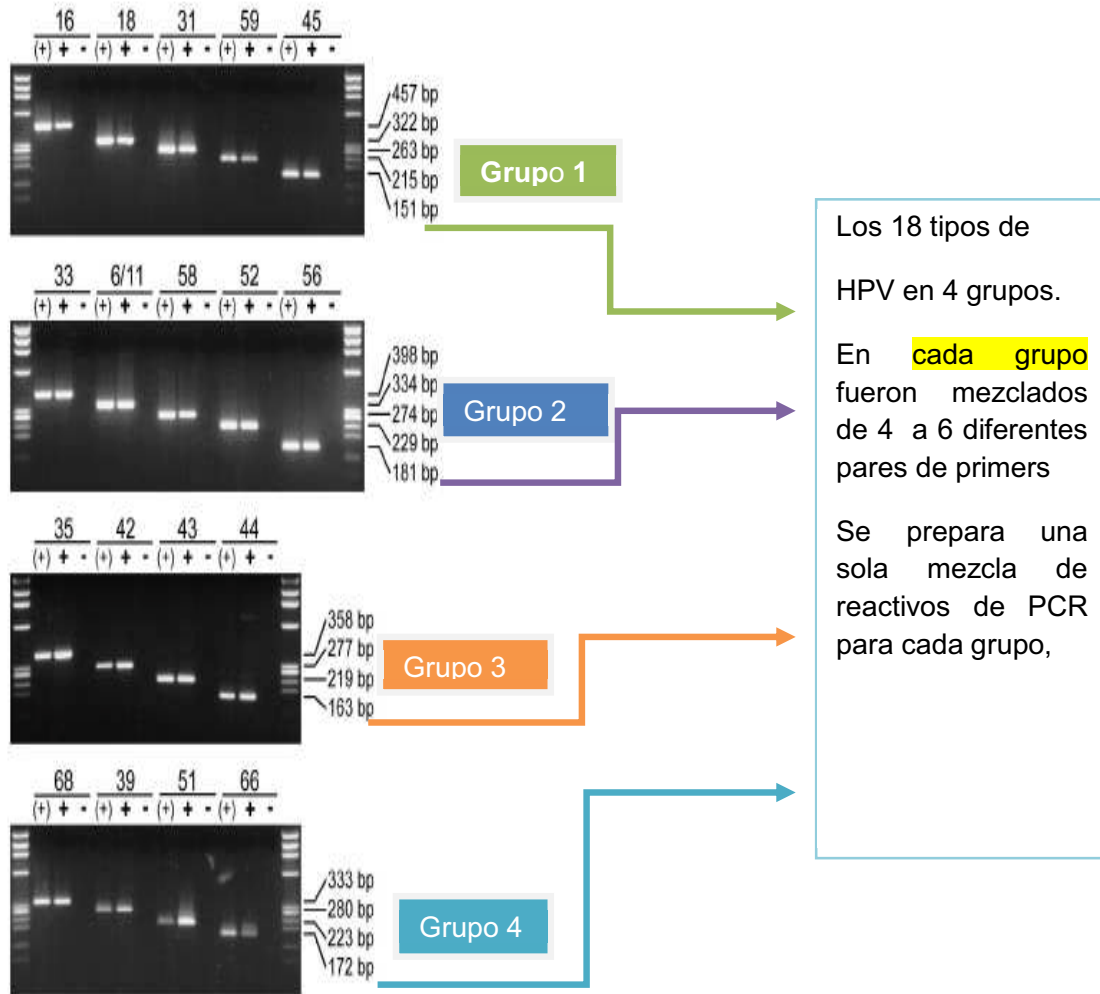


FIG. 3. Type-specific identification of HPV DNA. Eighteen primer pairs for type-specific HPV detection by nested PCR were arranged in four multiplex cocktails. The ability of each primer pair to detect HPV DNA is demonstrated by amplification of the corresponding HPV type from a single plasmid [lanes (+)] and from a cocktail containing all 18 HPV genotypes addressed in the study (lanes +). The specificity of each primer pair was demonstrated by the absence of unspecific amplification products when the HPV plasmid or HPV DNA belonging to the primer tested was missing from the cocktail (lanes -). In all experiments 100 pg of plasmid DNA (10^7 viral copies) was amplified.

Finalmente, para determinar el tipo del VPH en todas aquellas muestras en las que hay duda en el PCR o que los primers no estén diseñadas adecuadamente se realiza la técnica de

secuenciación directa de los productos de la PCR mediante el kit de Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing (Amersham Pharmacia Biotech) y marcaje con fósforo 33 (Amersham Pharmacia Biotech), se realiza electroforesis en gel de acrilamida 8%, urea 7M, a 1 800 volts. Para determinar el tipo viral, la secuencia obtenida se incorpora a un banco de datos (BLAST) para su comparación con las secuencias del ADN existentes del VPH.(3).

En los últimos años se han desarrollado nuevas herramientas para realizar PCR múltiple, llegando, con la mejora de los equipos, a correr los 16 tipos de VPH que afectan el tracto genital, en un solo PCR (22), sin embargo esa tecnología aún no está disponible en nuestro medio.

La importancia de la Prueba del ADN del VPH en la Medicina clínica radica en que el screening o tamizaje del cáncer cervical sobre la base de pruebas para el virus del papiloma humano (VPH) aumenta la sensibilidad de detección de lesiones de alto grado, y la presencia de neoplasia intraepitelial cervical, pero aún se desconoce el impacto que esto pudiera tener sobre el Cáncer Cérvico Uterino, aun no se sabe si este aumento representa un sobre diagnóstico o es la base para la protección contra una lesión de alto grado o una neoplasia cervical en el futuro.

En un estudio realizado en Suecia , una población de 12,527 mujeres entre 32 a 38 años de edad, fueron asignadas aleatoriamente en 2 grupos . A un grupo se le realizó una prueba del VPH además de una Citología Cervical con tinción de Papanicolaou (grupo de intervención), mientras que en el otro grupo solo se realizó la prueba de Papanicolaou (grupo control). A las mujeres que dieron positivo en la prueba de VPH con una prueba de Papanicolaou normal, se les ofreció una segunda prueba del VPH por lo menos 1 año más tarde, y las que resultaron tener una infección persistente, con el mismo el tipo de VPH de alto riesgo, se les ofreció colposcopia con biopsia de cuello uterino. Durante el seguimiento de estas pacientes en el grupo de intervención se detectaron lesiones de alto grado en una proporción mucho mayor que en el grupo control. La sensibilidad del Papanicolaou más la prueba de VPH aumento hasta un 51% en las pacientes con Lesiones NIC 2 ó 3 que las que no se utilizaron ambas. (23)

Por otro lado está bien establecida la importancia de la tipificación de HPV, en las pacientes con Papanicolaou con ASCUS, en el cual se ha detectado el 70% la presencia del VPH; sin embargo se ha establecido la utilidad en mujeres arriba de 30 años, ya que se han observado que aún los VPH de alto riesgo han sido de una presencia pasajera en lesiones

de bajo grado, como NIC I.

Por lo tanto la Prueba de VPH está indicada en la práctica médica y clínica, en los siguientes casos:

1. Pacientes mayores de 35 años, practicándola cada 2 a 3 años
2. Pacientes con Papanicolaou con diagnóstico ASCUS
3. Pacientes tratadas con conización por Ca In situ o Lesiones de alto Grado recurrentes. (24,25).

3.4 VACUNAS CONTRA VPH

El desarrollo de una vacuna para la inmunización de las mujeres en contra de los serotipos de HPV de alto riesgo más frecuentes asociados a Cáncer Cervical, es ya una realidad, y aunque se dispone de la misma desde Octubre de 2002, las 2 presentaciones que se encuentran en el mercado, aún no han tenido la difusión esperada, entre otras cosas por el precio de las mismas (20)

La comprensión de la patogénesis molecular de la infección del VPH es importante para cumplir objetivos específicos al elegir una vacuna contra HPV. Se ha propuesto 2 tipos de vacunas contra el VPH las terapéuticas, que están dirigidas a erradicar o reducir las células infectadas y pueden disminuir el desarrollo de las células con neoplasias ; estas también se han utilizado como un enfoque para erradicar las verrugas genitales; y las preventivas que protegen al huésped de la infección del VPH, siendo estas últimas las más efectivas, estas están preparadas a partir de partículas similares al virus (Virus Like Particles), altamente purificadas de proteínas de la cápside mayor L1, producidas por fermentación en cultivos recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*. No contienen ADN viral, por lo tanto no son infectantes pero sí generan inmunidad.

Dos vacunas han sido desarrolladas: Gardasil®, una vacuna cuadrivalente contra los serotipos VPH-6, -11, -16 y -18; y Cervarix®, una vacuna bivalente que proporciona inmunidad contra los tipos de VPH-16 y -18, que son los más comúnmente asociados a cáncer cervical, también proporciona cierta inmunidad cruzada contra los tipos 31 y 45. (26,27)

Cervarix está elaborada a base de Virus Like Particles (VLP), induce una fuerte respuesta inmunológica con elevados niveles de anti L1 que persisten en niveles mucho mayores que

los observados en una infección natural, tiene en su composición monofosforil lípido A absorbido en hidróxido de aluminio, se administra en tres dosis en un lapso de 6 meses, usualmente a los 0, 2 y 6 meses. En estudios con pacientes seronegativos a los que se les administro el esquema de vacunación se han demostrado altos niveles de anticuerpos los cuales se han mantenido hasta 8.4 años después de la vacunación. Aparentemente la respuesta inmunológica es mayor que con la vacuna cuadrivalente, según se demuestra en estudios con mujeres entre 10 y 55 años, en general es bien tolerada y la administración de una cuarta dosis, de refuerzo, provoca niveles elevados de anticuerpos de una manera rápida.

Gardasil también está elaborada a base de Virus Like Particles, está indicada desde los 9 años tanto para la prevención del Cáncer Cérvico Uterino como de la condilomatosis genital, su esquema de vacunación es similar al de Cervarix, administrándose 3 dosis en 6 meses a los 0, 3 y 6 meses. Ha sido utilizada en pacientes entre 9 y 45 años sin ningún tipo de complicación, y en estudios comparado con placebo no existe diferencia entre las complicaciones de los 2 grupos, produce una memoria inmunológica prolongada y muy potente; no tiene efecto en las infecciones por VPH presentes en el momento de la vacunación pero si previene una reinfección en las pacientes vacunadas. Se ha demostrado la presencia de anticuerpos hasta 4 años después de la vacunación, presentando altos niveles circulantes de los mismos, sin embargo los niveles de anticuerpos circulantes no tienen relación con la respuesta antigénica, produciendo respuestas elevadas con la exposición al VPH aun cuando los niveles de anticuerpos circulantes sean bajos. (28,29)

En ensayos clínicos la vacunación contra VPH ha demostrado ser segura, altamente efectiva y muy inmunogénica contra la infección por los tipos específicos de VPH que cubre. Análisis estadísticos predictivos indican que la implementación de la vacunación contra VPH junto a un programa de screening a través de citologías Cérvico Vaginales tendrían un gran impacto en los programas de Salud con una buena relación costo efecto que los hacen aplicables a la práctica clínica para el control del Cáncer Cérvico Uterino (30)

IV OBJETIVOS:

4.1 Objetivo General

4.1.1 Detectar e Identificar mediante la prueba de reacción de la polimerasa en cadena (PCR) el o los Virus del Papiloma Humano (VPH) presentes en mujeres, atendidas en las clínicas de consulta externa del INCAN, con diagnóstico histopatológico de Carcinoma Cérvico Uterino

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Relacionar la presencia de VPH de alto grado con la presencia de Carcinoma Cérvico Uterino

4.2.2 Establecer cuáles son los tipos más frecuentes de VPH en la población guatemalteca, con diagnóstico de Cáncer Cérvico Uterino

4.2.3 Determinar los tipos más frecuentes de VPH en pacientes con diagnóstico de Carcinoma Cérvico Uterino, según el tipo histológico Epidermoide, Mixto Adeno-Escamoso o Adenocarcinoma.

4.2.4 Establecer la presencia y frecuencia de coinfecciones causadas por VPH, ya sean estos de Bajo o Alto grado, así como sus combinaciones en pacientes con diagnóstico de Cáncer Cérvico Uterino.

4.2.5 Determinar los tipos histológicos más frecuentemente asociados a cada una de las combinaciones de VPH en las pacientes con coinfecciones

4.2.6 Determinar, según la prevalencia de los virus identificados en pacientes con Carcinoma Cervicouterino, si alguna de las vacunas preventivas contra las infecciones a VPH existentes en nuestro medio podría ser de recomendada como parte de un programa general de inmunización.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Muestra y Población

El estudio es de tipo descriptivo. Se incluyó mujeres Guatemaltecas que asistieron a la consulta externa de INCAN, ya sea en forma espontánea o referidas de otros Hospitales, con diagnóstico Histopatológico de Carcinoma Cérvico Uterino, sin importar su tipo, durante el periodo comprendido entre Enero de 2009 a Febrero de 2011. El estudio no represento ningún costo adicional para las participantes ya que todos los gastos fueron sufragados por el investigador.

A todas las muestras recolectadas se les realizó la detección de ADN del virus del papiloma humano mediante una de las técnicas de reacción de la polimerasa en cadena (PCR) llamada Nested o anidada Múltiplex.

5.2. Criterios de Inclusión

Pacientes femeninas, que asistieron a la Consulta Externa del INCAN sin antecedentes de terapia antineoplásica ó inmuno moduladora, con diagnóstico Histopatológico de Cáncer Cérvico Uterino, Epidermoide, Adenocarcinoma o Mixto Adeno-Escamoso, realizado en biopsia de Cérvix por el departamento de Patología del INCAN.

5.3. Criterios de Exclusión

Pacientes que ya hubieran recibido tratamientos previos antineoplásicos o inmuno moduladora.

5.4 Estandarización del PCR y Nested Multiplex-PCR

Para la estandarización se utilizaron 20 muestras que previamente habían sido diagnosticadas como VPH positivo con baja y alta carga viral, para estandarizar el PCR (primers My9-11) y el Multiplex PCR.

5.5 Captación y toma de muestras

Las muestras fueron obtenidas de pacientes que asistieron a la consulta externa del INCAN con Diagnóstico de Carcinoma de Cérvix por medio de estudio Histológico, dicho diagnóstico fue confirmado, por políticas de la institución, con biopsias analizadas por el departamento de patología del INCAN. Las pacientes fueron elegidas al azar, y si cumplían con los criterios de inclusión se les realizaba una biopsia adicional para realizar en paralelo la prueba de PCR para la detección de VPH.

Previamente a la toma de la muestra la paciente no debía haber tenido, en las 72 horas previas, relaciones sexuales y ningún tratamiento vaginal. La muestra se tomó por medio de una pinza de biopsia cervical. Las muestras fueron colocadas en un medio especial a temperatura ambiente y posteriormente trasladadas al laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de USAC, CUM zona 11 de la Ciudad de Guatemala.

Transporte

Como medio de transporte para las biopsias del cuello uterino, se utilizó cinco mililitros de un tampón de fosfatos (PBS). Estos fueron mantenidos a 4°C hasta llegar al laboratorio y allí almacenarlos en refrigeración a 4°C previo a extraer ADN.

Preservación

Se realizó la homogenización utilizando un vortex a alta velocidad; con centrifugación por 10 minutos a 3,000 g X.

Las células fueron re suspendidas en 100 µl de Tris EDTA (TE) (50 mmol/L TRIS, 1 mmol/L EDTA pH 8.5), conteniendo Tween 20 al 0.5% y 200 µg/ml de proteinasa K.

Se incubaron por tres horas a 55°C. Luego la proteinasa K fue inhibida por calor a 95°C por 10 minutos.

Luego de la centrifugación, el sobrenadante fue usado para la amplificación por PCR

5.6 Extracción y purificación del ADN

1. La muestra fue suspendida en 180 µl Solución de Lisis T (B6678) + 20 µl proteinasa K, luego de mezclarla se incubo a 55 °C por un lapso de 2 a 4 horas. Después de la digestión se agregó RNasa 20 µl y se incubo por 2 minutos a temperatura ambiente.
2. Para la lisis Celular se agregaron 200 µl de Solución de lisis C (B8803) a la muestra, y se mezcló en el vortex por 15 segundos. La mezcla debía estar homogénea y luego se incubaba a 70°C por 10 minutos.
3. Se agregó 500 µl de la solución denominada COLUMN PREPARATION SOLUTION a cada tubo con el anillo rojo; para luego centrifugar a 12,000 rpm por 1 minuto, se eliminó lo que llegaba al fondo de este tubo. En esta solución el ADN quedaba “pegado” al anillo.
4. Se preparó BINDING, agregando 200 µl de etanol al 100% al lisado; se mezcló vigorosamente de 5 a 10 segundos para obtener una solución homogénea
5. Para descargar el lisado se transfirió el total del contenido anterior al tubo con el anillo (preparado anteriormente) vertiéndolo por encima del anillo. Se centrifugo a 6,500 revoluciones por 1 minuto y se eliminó lo que se depositó en el fondo del tubo. Se transfirió la columna (tubo interno que contiene el filtro con el anillo rojo) y coloco en otro tubo de 2ml de colección
6. Esto se agregaba al tubo con anillo rojo ya preparado previamente
7. Para el primer lavado con Solución de WASH. Se agregó 500 µl por encima del filtro y se centrifugo a 6,500 revoluciones por 1 minuto, se eliminó lo que se depositaba al fondo del tubo y se transfirió la columna con el filtro a otro tubo de 2ml de colección.
8. En el segundo lavado con solución de WASH, se agregó nuevamente 500 µl de esta solución por encima del filtro con anillo rojo, se centrifugo a 12,000-13,000 rpm por 3 minutos hasta secar la columna con anillo rojo. Si no se secaba se añadía otro minuto, luego se eliminaba lo que se depositaba al fondo del tubo y se transfería la columna con el filtro a otro tubo de 2 ml de colección.
9. Para la extracción por disolución del ADN desde la columna (ELUTION DNA) se pipeteo 200 µl de ELUTION SOLUTION directamente en el centro de la columna Binding; se centrifugo por 1 minuto a 6,500 revoluciones por 1 minuto para obtener el DNA. Para incrementar la extracción por disolución del ADN se dejó esta solución por 5 minutos a temperatura ambiente previo a la centrifugación. El ADN obtenido se almaceno entre 2 y 8°C.

| Tipo VPH | Secuencias de primers | tamaño producto |
|----------|------------------------|-----------------|
| VPH16F | TATGCACAGAGCTGCAAACAAC | 296pb |
| VPH16R | TTCAGGACACAGTGGCTTTTGA | |
| VPH18F | ACCTGATCTGTGCACGGAAC | 386pb |
| VPH18R | TGCAGCACGAATGGCACTGG | |
| VPH31F | GGCATTGGAAATACCCTACGAT | 489pb |
| VPH31R | GGGTAATTGCTCATAACAGTGG | |
| VPH33F | AACGCCATGAGAGGACACAAG | 197pb |
| VPH33R | GTGGTGTTACAAGTGTGACAAC | |
| VPH35F | ACAAGAATTACAGCGGAGTGAG | 327pb |
| VPH35R | GTTGGTTTCCAACAGGACATAC | |
| VPH39F | GTGTCTATTGCAGACGACCAC | 244pb |
| VPH39R | CACAGCGGTTTCAGACAACAC | |
| VPH45F | GACCCTACAAGCTACCAGATTT | 414pb |
| VPH45R | CTTGCCGTGCCTGGTCACAA | |
| VPH51R | AAAGACCACTTGGGCCTGAAG | 389pb |
| VPH51F | ACGCGAAGGGTGTCTCCACT | |
| VPH52R | ACCCTGCACGAATTGTGTGAG | 308pb |
| VPH52F | TCAGGACATAATGGCGTTTGAC | |
| VPH68R | AGGGACGGGGTACCATTAGC | 189pb |
| VPH68F | CCTTAGTTTTTCAGCAGGACTC | |

| | | |
|--------|--------------------------|-------|
| VPH56F | CCACAATTCAACAATCCACAGG | 428pb |
| VPH56R | TGTCTCCAGCACCCCAAACAT | |
| VPH58F | TGTCAAAGACCATTGTGTCCAC | 156pb |
| VPH58R | CTCTCATGGCGTTGTTACAGG | |
| VPH59F | CACCGTATGCAGCGTGTCTG | 283pb |
| VPH59R | GCTTGTCGTTGCTGTCTTAGG | |
| VPH6F | GCAGCCTGCGCGTGCTGCCTAG | 256pb |
| VPH6R | CTTCCATGCATGTTGTCCAG | |
| VPH11F | GCCTCCACGTCTGCAACATC | 424pb |
| VPH11R | CTTCCATGCATGTTGTCCAG | |
| VPH66F | TTCAGTGTATGGGGCAACAT | 172pb |
| VPH66R | AAACATGACCCGGTCCATGC | |
| VPH42F | CCCAAAGTAGTGGTCCCAGTTA | 277pb |
| VPH42R | GATCTTTCGTAGTGTGCGCAGTG | |
| VPH43F | GCATAATGTCTGCACGTAGCTG | 219pb |
| VPH43R | CATGAAACTGTAGACAGGCCAAG | |
| VPH44F | TAAACAGTTATATGTAGTGTACCG | 163pb |
| VPH44R | TATCAGCACGTCCAGAATTGAC | |

El producto de la extracción fue cuantificado por espectrofotómetro y diluida las muestras para una concentración final 50 ng/ µl

5.7 Detección y Tipificación del VPH

En las muestras obtenidas de ADN que fueron sometidas a la detección del VPH, se identificó, como paso inicial, el gen de la β -globina y el MY09/11, amplificándolos por PCR e identificándolos por electroforesis en gel agarosa al 1.2 %, con peso Molecular de 268 a 290 pb para β -globina y 450 pb para MY09/11. Esto confirmaba la calidad del ADN extraído al ser positivo para β -globina y confirmaba la presencia de ADN viral de VPH al ser positiva para MY09/11, identificando así cualquier tipo de VPH. Luego se procedió a la serotipificación del VPH utilizando el método de PCR Múltiple Anidado,

Se utilizó este sistema porque permite que en una misma reacción se mezclen “primers” de diferentes serogrupos de VPH, los cuales co-amplifican en presencia del VPH específico. Se utilizaron mezclas de primers para obtener productos de diferente tamaño molecular y poder hacer la diferenciación de los mismos al visualizarlos en gel de agarosa.

Todas aquellas muestras que fueron positivas con los primers generales MY09/11 fueron reevaluadas mediante dos Multiplex-PCR-VPH para establecer el o los serogrupos de VPH que causaban la infección. La secuencia de primers que se utilizó fue la siguiente:

La detección de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa al 3% y se visualizó con bromuro de etidio ($C_{21}H_{20}BrN_3$) y luz ultravioleta. En cada uno de los geles se realizó los controles positivo y negativo de la prueba. La extracción de ADN y sus productos por PCR fueron almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.8 RECOLECCIÓN DE DATOS

Los datos fueron recolectados en una boleta diseñada para el efecto, la cual se adjunta en la sección de anexos.

5.9 VARIABLES

En la siguiente tabla se encuentran las variables del estudio, según definición e indicador

CUADRO # 7

| VARIABLES | DEFINICION | INDICADOR |
|--|---|--|
| Lesión de Cáncer invasor | Diagnostico Histopatológico | Carcinoma Invasivo Epidermoide, Adenocarcinoma y Mixto Adeno Escamoso |
| Tipos de VPH | Diagnóstico Biomolecular Amplificación del ADN viral específica para Serotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ,66 , 68 , 6 y 11. | Prueba de PCR, para Cada tipo de VPH Positivo Negativo |
| Prevalencia de cada tipo de VPH en lesiones de cáncer invasor tipo Epidermoide | Muestras positivas de cada tipo de VPH dividido la totalidad de muestras con Cáncer invasor tipo Epidermoide por 100 | (No de casos positivo a VPH según tipo) X 100 / (No casos con lesiones de Cáncer Epidermoide) |
| Prevalencia de cada tipo de VPH en lesiones de cáncer invasor tipo Adenocarcinoma | Muestras positivas de cada tipo de VPH dividido la totalidad de muestras con Adenocarcinoma invasor por 100 | (No de casos positivo según tipo) X 100 / (No casos con lesiones de Adenocarcinoma) |
| Prevalencia de cada tipo de VPH en lesiones de cáncer invasor tipo Mixto | Muestras positivas de cada tipo de VPH dividido la totalidad de muestras con Cáncer invasor tipo Mixto por 100 | (No de casos positivo según tipo)) X 100 / (No casos con lesiones de Cáncer Mixto) |

VI. RESULTADOS DISCUSION Y ANALISIS

6.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE LA MUESTRA.

En el cuadro número 8 se presenta la distribución de la edad de las pacientes incluidas en el estudio distribuidas en intervalos de 10 años. La paciente más joven incluida en el estudio tenía 22 años y la mayor 79, el 50% de las pacientes tenían una edad menor a los 50 años, siendo el 73% de las pacientes menores de 60 años, el promedio de edad de las pacientes fue de 49.9 años, edad en que las pacientes se encuentran en la etapa productiva de sus vidas, razón por la cual la pérdida de años de trabajo y años de vida en estas pacientes es alta, lo que se traduce en un alto impacto en la sociedad por esta patología

Cuadro # 8
DISTRIBUCIÓN POR EDAD DE LOS PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE
CARCINOMA CERVICAL

| EDAD | NUMERO DE PACIENTES | PORCENTAJE |
|-------|---------------------|------------|
| 20-29 | 2 | 6.66 |
| 30-39 | 8 | 26.66 |
| 40-49 | 5 | 16.66 |
| 50-59 | 7 | 23.33 |
| 60-69 | 5 | 16.66 |
| 70-79 | 3 | 10.00 |

Fuente Registros Médicos INCAN

En el Cuadro Numero 9 se distribuyen las pacientes según el número de Gestaciones que habían tenido hasta el momento de la consulta. No se presentó ninguna paciente que estuviera embarazada al momento de ser incluida dentro del estudio. Se ha relacionado el apareamiento de Carcinoma Cérvico Uterino a la multiparidad. En nuestro estudio, la mayoría de las pacientes tenían más de tres gestaciones lo que corresponde a el 73.33% del total de pacientes estudiadas. Sin embargo con los datos disponibles no se puede concluir

que ha mayor número de hijos más probabilidades de desarrollar Cáncer Cérvico Uterino, para esto debiera hacerse un estudio poblacional correlacionando la paridad con el apareamiento de Cáncer cervical.

Cuadro # 9

DISTRIBUCIÓN SEGÚN NUMERO DE GESTACIONES

| NUMERO DE GESTACIONES | NUMERO DE PACIENTES | PORCENTAJE |
|-----------------------|---------------------|------------|
| 1 – 3 | 8 | 26.66 |
| 4 – 6 | 12 | 40.00 |
| 7 o + | 10 | 33.33 |

Fuente Registros Médicos INCAN

Las muestras de las pacientes se clasificaron según el tipo de Lesión detectada por biopsia del cérvix, en 3 grupos denominados: Carcinoma Escamoso del Cérvix, Adenocarcinoma del Cérvix y Carcinoma Mixto Adeno-Escamoso del Cérvix. No se incluyó en el estudio otro tipo de neoplasias malignas del Cérvix, como Carcinomas Neuroendocrinos, Melanomas, Invasión por Adenocarcinomas Endometriales, Sarcomas, etc., ya que la asociación de VPH y neoplasias del cérvix ha sido únicamente reportada en los Cánceres Epiteliales del mismo.

En el Cuadro Numero 10 se encuentra tabulada la distribución de las pacientes según la estirpe histológica del Carcinoma. La mayoría de las pacientes presento diagnóstico de Carcinoma Epidermoide según lo esperado

Cuadro # 10

DISTRIBUCIÓN SEGÚN ESTIRPE HISTOLÓGICA DE LAS PACIENTES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO.

| ESTIRPE HISTOLÓGICA | NUMERO PACIENTES | DE PORCENTAJE |
|--|-----------------------------|----------------------|
| ADENOCARCINOMA | 2 | 6.66 |
| CARCINOMA MIXTO ADENOESCAMOSO | 4 | 13.33 |
| CARCINOMA EPIDERMÓIDE | 24 | 80.00 |

Fuente registros médicos INCAN

En el Cuadro Numero 11 se encuentran distribuidas las pacientes del estudio, según el estadio clínico, no existe ninguna paciente en estadio 0 ni I ya que generalmente estas pacientes son vistas en las clínicas de colposcopia del INCAN y no en la consulta externa; todas las pacientes pertenecieron al estadio II o III de la Figo, 66.66% de las pacientes se encontraban en un estadio clínico II B al ser diagnosticadas. En la muestra, posiblemente por el azar no se encontró ninguna paciente en estadio IV.

Cuadro # 11

DISTRIBUCIÓN SEGÚN ESTADIO CLÍNICO DE LAS LESIONES

| ESTADIO CLÍNICO | NUMERO DE PACIENTES | PORCENTAJE |
|------------------------|----------------------------|-------------------|
| II B | 20 | 66.66 |
| III A | 1 | 3.33 |
| III B | 9 | 30.00 |

Fuente Registros Médicos INCAN

6.2 RESULTADOS DE LA TIPIFICACION DE VPH

En el Cuadro Numero 12, se presentan los diferentes tipos de VPH encontrados en las muestras de las pacientes con Cáncer Cérvico Uterino, podemos observar que existe similitud en los datos obtenidos y los reportes de la literatura mundial. Es de hacer notar que aunque solo se estudiaron 30 muestras de pacientes con Cáncer de Cérvix, el número total de casos en los que se identificó ADN viral de VPH asociado a Cáncer Cérvico Uterino reportados es de 39 y esto se debe a que en 9 casos las muestras estaban infectadas por 2 tipos diferentes de virus. A nivel latinoamericano se ha reportado la asociación de Cáncer de Cérvix a la presencia de VPH tipo 16 en promedio, en un 50.4 %, mientras que en nuestro estudio, VPH tipo 16 fue asociado a Carcinoma de Cérvix en un 63.33%. Por otro lado los tipos 18 y el 58 se asociaron al Cáncer Cérvico Uterino en un 16.66% cada uno, siendo la asociación entre VPH 18 y Cáncer de Cérvix a nivel latinoamericano, en promedio, de un 9.07%. En total el 79.99 % de los casos se asociaron a la presencia de ADN de VPH 16 y 18 en los pacientes estudiados. El 100% de nuestros pacientes fue positivo para ADN viral de VPH de alto riesgo. En las muestras analizadas se logró identificar coinfecciones en 9 casos. De todos los casos estudiados cuando se presentó coinfección se logró aislar 2 tipos de ADN viral, no encontramos coinfecciones con más de 2 tipos de virus simultáneamente, aunque en la literatura mundial se han reportado coinfecciones por 3, 4 y hasta 5 genotipos de VPH. (30)

Es de hacer notar que en nuestros casos siempre estuvo presente VPH tipo 16 asociado a otro virus de alto riesgo, estos datos se presentan en el cuadro número 13. Esto coincide con la literatura mundial según la cual la presencia de infección por VPH 16 parece aumentar el riesgo de adquirir una nueva infección por VPH de otro tipo, sin tener influencia sobre la persistencia o la resolución de la infección (35). Sin embargo basándonos en los datos disponibles no se puede precisar en qué grado contribuyo cada uno de los tipos virales al desarrollo de la neoplasia, o si esta fue debida únicamente al alto potencial oncogénico de VPH tipo 16. En todos los casos de coinfección ambos virus fueron de alto riesgo, no se logró documentar en ningún caso la coinfección entre virus de alto y bajo riesgo. Como dato interesante se menciona que todas las pacientes con coinfecciones se presentaron con diagnostico histológico de Carcinoma Epidermoide, no se encontró ningún caso entre las pacientes con coinfecciones que presentara componente glandular (adeno)

Cuadro # 12

DISTRIBUCIÓN SEGÚN SEROTIPO DE VPH IDENTIFICADO

| SEROTIPOS | FRECUENCIA | PORCENTAJE |
|-----------|------------|------------|
| 16 | 19 de 30 | 63.33 |
| 18 | 5 de 30 | 16.66 |
| 58 | 5 de 30 | 16.66 |
| 31 | 3 de 30 | 10.00 |
| 33 | 2 de 30 | 6.66 |
| 51 | 2 de 30 | 6.66 |
| 39 | 2 de 30 | 6.66 |
| 45 | 1 de 30 | 3.33 |

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular y Celular USAC

Cuadro # 13

FRECUENCIA Y SEROTIPOS DE LAS COINFECCIONES DE HPV

| SEROTIPOS | FRECUENCIA | PORCENTAJE |
|-----------|------------|------------|
| 16 y 58 | 3 de 9 | 33.33 |
| 16 y 33 | 2 de 9 | 22.22 |
| 16 y 39 | 2 de 9 | 22.22 |
| 16 y 31 | 1 de 9 | 11.11 |
| 16 y 51 | 1 de 9 | 11.11 |

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular y Celular USAC

En el cuadro número 14 se presenta la distribución de las pacientes con coinfecciones según su edad agrupadas en intervalos. Las coinfecciones estuvieron presentes en todos los

grupos etarios, siendo la más joven una paciente de 22 años y la más anciana una paciente de 76 años, la mayor cantidad de pacientes con coinfecciones se presentó en el grupo de edad comprendido entre 50 y 59 años. La lógica hace suponer que las pacientes de más edad, debido a que han tenido más tiempo de vida sexual activa se encuentran más vulnerables a múltiples infecciones por VPH, y por lo tanto a presentar coinfecciones por el mismo; esto puede verse afectado tanto por el número de parejas sexuales como por los hábitos sexuales de las pacientes y sus parejas.

Cuadro # 14
DISTRIBUCIÓN SEGÚN SEROTIPOS Y EDAD DE LAS PACIENTES CON
COINFECCIONES POR VPH

| EDAD | 16 y 58 | 16 y 33 | 16 y 39 | 16 y 31 | 16 y 51 |
|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 20 – 29 | | 1 | | | |
| 30 – 39 | | 1 | | 1 | |
| 40 – 49 | 1 | | 1 | | |
| 50 – 59 | 1 | | 1 | | 1 |
| 60 – 69 | | | | | |
| 70 – 79 | 1 | | | | |
| TOTAL | 3 | 2 | 2 | 1 | 1 |

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular y Celular USAC

Cuadro # 15
DISTRIBUCIÓN SEGÚN SEROTIPO Y ESTIRPE HISTOLÓGICA

| SERO-TIPO | EPIDERMOIDE | ADENO | MIXTO | TOTAL |
|-----------|-------------|-------|-------|-------|
| 16 | 16 | 1 | 2 | 19 |
| 18 | 3 | 1 | 1 | 5 |

| | | | | |
|----|---|--|---|---|
| 58 | 4 | | 1 | 5 |
| 31 | 3 | | | 3 |
| 33 | 2 | | | 2 |
| 51 | 2 | | | 2 |
| 39 | 2 | | | 2 |
| 45 | 1 | | | 1 |

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular y Celular USAC

El cuadro numero 15 muestra la distribución según el diagnóstico histológico y el tipo de ADN para VPH detectado. En la mayoría de los casos el diagnóstico histológico fue de carcinoma epidermoide, esto era lo esperado ya que esta es la neoplasia maligna más frecuente en el Cérvix, únicamente en un 20% el componente adeno fue reportado, sin embargo llama la atención que la proporción del mismo es significativamente mayor al encontrarse VPH tipo 18. Un 40% de los casos positivos a VPH 18 presentaron componente glandular, contra 15% asociado a VPH 16 , 20% asociada a VPH 58 y 11.76% cuando se incluyen todos los demás tipos de virus, excepto el 18. Pareciera ser que la presencia de VPH 18 predispone más al apareamiento del componente glandular (adeno) en las neoplasias del Cérvix. Al realizar un análisis de varianza por diferencia de proporciones se encontró que la diferencia fue estadísticamente significativa a un nivel de 0.90, con un valor de z de 1.37 al compararlo con VPH 16 y con un valor z de 1.68 al compararlo con todos los grupos reunidos lo que da una significación a un nivel de 95%, sin embargo al compararse el porcentaje de positividad al componente adeno y la presencia de VPH 58 contra la presencia de VPH 18, la diferencia no es estadísticamente significativa. A pesar de lo anteriormente expuesto, por lo pequeño de la muestra, no se tiene la suficiente fuerza estadística para asegurar con certeza que VPH 18 se asocia más que los otros tipos de VPH de alto riesgo a Adeno Carcinoma y Carcinoma Mixto del Cérvix, por lo que debiera realizarse un estudio únicamente con los Carcinomas de Cérvix con componente adeno para confirmar esta asociación.

6.3CONCLUSIONES

- 1) El 100% de las pacientes con diagnóstico de Cáncer Cérvico Uterino fueron positivas, en nuestro estudio, a la presencia de ADN viral, lo que confirma la infección por VPH como factor etiológico del Cáncer Cérvico Uterino.
- 2) VPH 16 y 18 son los tipos más frecuentes en el presente estudio asociándose a la presencia de Cáncer Cérvico Uterino VPH 16, en un 63.33% , y VPH 18 en un 16.66% de los casos.
- 3) VPH tipo 16 es el genotipo más frecuentemente asociado a Cáncer Cérvico Uterino de la variedad epidermoide lo que coincide con la literatura internacional.
- 4) La aparición de la variante adeno (adenocarcinoma puro y mixto adeno escamoso) se vio altamente relacionada a la presencia de VPH tipo 18 en las pacientes del estudio
- 5) Se presentaron coinfecciones en 30% de los pacientes del estudio encontrando en todas la asociación de 2 virus de alto riesgo.
- 6) En el 100% de las coinfecciones estuvo presente VPH 16 asociado a otro virus de alto riesgo
- 7) Todos los pacientes con coinfecciones presentaron carcinoma del cérvix de la variedad epidermoide.
- 8) La vacunación con la Vacuna Bivalente en nuestro medio podría tener un alto impacto en la incidencia de Cáncer Cérvico Uterino al proteger contra VPH 16 y 18 que son los 2 tipos más frecuentes asociados a esta patología en nuestra población y que en nuestro estudio explican, en conjunto el 79.99% de los casos.

6.4 RECOMENDACIONES

- 1) Realizar estudios que permitan confirmar la asociación entre VPH 18 y Cáncer Cérvico Uterino con componente glandular (Adenocarcinoma y Carcinoma Mixto Adeno-Escamoso)
- 2) Recomendar la Vacunación con Vacuna Bivalente como parte de las estrategias de Salud para el control del Cáncer Cérvico Uterino

VII. REVISION BIBLIOGRAFICA

- 1) Xavier Castellsagué, Alonso. "Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer". *Gynecologic Oncology* 110 (2008) S4–S7
- 2) ZurHausen H. "Papillomaviruse and cancer: From basic studies to clinical application". *Nat Rev Cancer* 2002; 2:342-350.
- 3) Adela Carrillo, et al. "Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones pre malignas". *Salud Pública de México* 2004 feb; 46 (1) : 7-15.
- 4) Silvana Luciani, Jon Kim Andrusb. "A Pan American Health Organization strategy for cervical cancer prevention and control in Latin America and the Caribbean". *Reproductive Health Matters* 2008;16(32):59–66
- 5) "Cervical cancer screening in developing countries : Report of a WHO consultation". ISBN 92 4 154572 0 World Health Organization 2002
- 6) "Comprehensive cervical cancer control : a guide to essential practice". ISBN 978 92 4 154700 0 World Health Organization 2006
- 7) Lewis, Merle J. "A situational analysis of cervical cancer in Latin America and the Caribbean". Washington, D.C. PAHO: 2004. ISBN 92 75 12531 7
- 8) Registro del Cáncer de Guatemala. Informe de los Casos de Cáncer registrados en el Instituto de Cancerología y Hospital Dr. Bernardo del Valle S. INCAN durante el año 2008. <http://regcangua.zzl.org>
- 9) Nubia Muñoz, M.D., F. Xavier Bosch, PH.D. "Cervical cancer and human papillomavirus: Epidemiological evidence and perspectives for prevention". *Salud Pública de México* ISSN 0036-3634 versión impresa Salud pública Méx v.39 n.4 Cuernavaca jul./ago. 1997
- 10) Molly C. Fey, FNP, MSN; Margaret W. Beal, CNM, PhD J Midwifery. " The Role of Human Papilloma Virus Testing in Cervical Cancer Prevention". *Women Health* 49(1):4-13, 2004. 2004 Elsevier Science, Inc.

- 11) Nubia Muñoz, M.D., F. Xavier Bosch, M.D., Silvia de Sanjosé, M.D., et al. "Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group". *N Engl J Med* 2003;348:518-27
- 12) Laura Leticia Tirado-Gómez, MC, ; Alejandro Mohar-Betancourt, MC PhDII, III; et al. "Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres mexicanas". *Salud pública Méx* v.47 n.5 Cuernavaca set./out. 2005
- 13) Chan, S.Y., Delius, H., Halpern, A.L., Bernard, H.U., "Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy". *J. Virol* 1995. 69, 3074– 3083
- 14) Thomas C. Wright, Jr., M.D., and Mark Schiffman, M.D. "Adding a Test for Human Papillomavirus DNA to Cervical-Cancer Screening" *N Engl J Med* 348;6 february 6, 2003
- 15) Yvonne Flores, MPH, Keerti Shah, MD, Dr PH, et al "Design and methods of the evaluation of an HPV-based cervical cancer screening strategy in Mexico: The Morelos HPV Study". *SaludPública de México / vol.44, no.4, julio-agosto de 2002*
- 16) Eduardo Lazcano-Ponce, Rolando Herrero, et al "Epidemiology Of Hpv Infection Among Mexican Women With Normal Cervical Cytology" *Int.J.Cancer*:91, 412– 420 (2001)
- 17) Molly C. Fey, FNP, MSN; Margaret W. Beal, CNM, PhD J Midwifery. "The Role of Human Papilloma Virus Testing in Cervical Cancer Prevention". *Womens Health* 49(1):4-13, 2004.2004
- 18) Shang-Lang Huang,¹Angel Chao et al. "Comparison between the Hybrid Capture II Test and an SPF1/GP6+ PCR-Based Assay for Detection of Human Papillomavirus DNA in Cervical Swab Samples". *J ClinMicrobiol.* 2006 May; 44(5): 1733–1739.
- 19) Leen-Jan van Doorn, AncoMolijn, Bernhard Kleter, WimQuint, and Brigitte Colau. "Highly Effective Detection of Human Papillomavirus 16 and 18 DNA by a Testing Algorithm Combining Broad-Spectrum and Type-Specific PCR". *J ClinMicrobiol.* 2006 September; 44(9): 3292–3298
- 20) Mike F. Janicek, MD andHervy E. Averette, MD. "Cervical Cancer: Prevention, Diagnosis, and Therapeutics". *CA Cancer J Clin* 2001; 51:92
- 21) K. Sotlar, D. Diemer, et al. "Detection and Typing of Human Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR" *.J. Clin. Microbiol.* 2004 42: 3176-3184

- 22) Morie Nishiwaki, Tomohiro Yamamoto, et al. "Genotyping of Human Papillomaviruses by a Novel One-Step Typing Method with Multiplex PCR and Clinical Applications". *Journal of Clinical Microbiology*, Apr. 2008, p. 1161–1168 Vol. 46, No. 4
- 23) Pontus Naucler, et al. "Human papillomavirus and Papanicolaou test to screen for cervical Cancer". *N. Eng. J. Med* 2007 oct357(16):1589-1597
- 24) Thomas C. Wright Jr., et al. "2006 Consensus guidelines for the Management of Women With Abnormal Cervical Screening Tests". *Journal of Lower Genital Tract Disease*, Volume 11, Number 4, 2007, 201Y222
- 25) Cuzick J, Beverly E. Ho, et al. "HPV testing in primary screening of older women". *Br J. Cancer* 1999; 81:554
- 26) Berumen J, Villegas N. "Vacunas Teerapeuticas recombinants contra el cancer de cuello uterino". *SaludPublicaMex* 1997;39:288-297
- 27) Zhou, J., Sun, X. Y., Stenzel, D. J. & Frazer, I. H. "Expression of vaccin recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles". *Virology* **185**, 251–257 (1991)
- 28) Kate McKeage and Barbara Romanowski. "AS04-Adjuvanted HumanPapillomavirus (HPV) Types 16 and 18 Vaccine (Cervarix)A Review of its Use in the Prevention of Premalignant Cervical Lesions and Cervical Cancer Causally Related to Certain Oncogenic HPV Types". *Drugs* 2011; 71 (4): 465-488
- 29) Paul L. McCormack and Elmar A. Joura. "Quadrivalent Human Papillomavirus (Types 6, 11, 16, 18) Recombinant Vaccine (Gardasil)A Review of its Use in the Prevention of Premalignant Genital Lesions, Genital Cancer and Genital Warts in Women". *Drugs* 2010; 70 (18): 2449-2474
- 30) M. Stanley. "Prevention strategies against the human papillomavirus: The effectiveness of vaccination". *Gynecologic Oncology* 107 (2007) S19–S23
- 31) Marie-Claude Rousseau, Joao S. Pereira, et al. "Cervical Coinfection with Human Papillomavirus (HPV) Types as a Predictor of Acquisition and Persistence of HPV Infection". *The Journal of Infectious Diseases* 2001;184:1508–17

IX ANEXOS

BOLETA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

| | | |
|-------------------------|--------|---------|
| NOMBRE | | |
| REGISTRO MEDICO | | |
| EDAD | | |
| GESTAS | PARTOS | ABORTOS |
| DIAGNOSTICO HISTOLÓGICO | | |
| ESTADIO CLÍNICO | | |
| CUANTIFICACIÓN DE ADN | | |
| SEROTIPO VPH | | |

El autor concede permiso para reproducir total o parcialmente y por cualquier medio la tesis titulada DETECCIÓN Y TIPIFICACION DE VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE CANCER CERVICO UTERINO EN EL INSTITUTO DE CANCEROLOGIA (INCAN) DE GUATEMALA POR MEDIO DE PCR ANIDADO MULTIPLE, para propósitos de consulta académica. Sin embargo quedan reservados los derechos de autor que confiere la ley, cuando sea cualquier otro motivo diferente al que se señala lo que conduzca a su reproducción y/o comercialización total o parcial

