

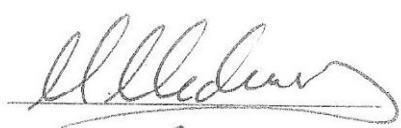
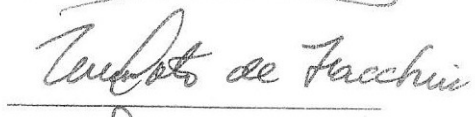
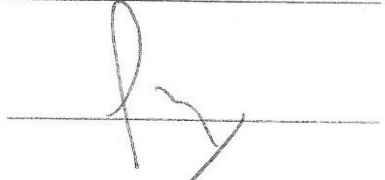
**EVALUACIÓN A TRAVÉS DEL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO
DE LA INFECCIÓN POR VIRUSPAPILOMA HUMANO
EN UNA POBLACIÓN FEMENINA**

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS

VEREDICTO

Nosotros, Miembros del Jurado designado para la Evaluación del Trabajo de Grado Titulado **"EVALUACIÓN A TRAVÉS DEL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA INFECCIÓN POR VIRUS PAPILOMA HUMANO EN UNA POBLACIÓN FEMENINA"**, presentado por la Ciudadana **HIMAN RICHANI S. C.I. N° 4.794.054** para optar al título de **DOCTORA EN CIENCIAS MÉDICAS**, acordamos que el mismo reúne los requisitos para ser considerado:

Aprobado - Mención Honorífica

<i>Nombre y Apellido</i>	<i>C.I.</i>	<i>Firma del Jurado</i>
Dra. Migdalia Medina	7047821	
Dra. Milagros Soto	4.462.222	
Dr. Jesús Leal	4576312	

En Valencia a los Veintitrés (23) días del mes de Octubre de Dos Mil Catorce

Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias de la Salud. Pabellón 6. Campus Universitario de Bárbula. Naganagua

AUTORIZACIÓN DEL TUTOR

Yo, **OLIVAR CASTEJÓN** en mi carácter de Tutor del Trabajo de Especialización_____ Maestría_____ Tesis_____ Doctoral **X** titulado: **“EVALUACIÓN A TRAVÉS DEL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA INFECCIÓN POR VIRUS PAPILOMA HUMANO EN UNA POBLACION FEMENINA”**

Presentado por el (la) ciudadano (a) **HIMAN RICHANI**

titular de la Cédula de Identidad N° **4.794.054**

para optar al título de **DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS** considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometidos a la presentación pública y evaluación por parte del jurado examinador que se designe.

En Valencia a los **09** días del mes de **JUNIO** del año Dos Mil **CATORCE**



Dr. OLIVAR CASTEJÓN
C.I. 3.380.062





UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS



ACTA DE APROBACIÓN DEL PROYECTO DE TESIS DOCTORAL

Los Miembros de la Comisión Coordinadora del Doctorado en Ciencia Médicas, hacen constar que han leído el Proyecto de Grado, presentado por la ciudadana: **HIMAN RICHANI**, Cédula de Identidad N° **4.794.054**, para optar al Título de Doctor en Ciencias Médicas cuyo título es: **“EVALUACIÓN A TRAVÉS DEL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA INFECCIÓN POR VIRUSPAPILOMA HUMANO EN UNA POBLACIÓN FEMENINA”** y tomada en cuenta la opinión de la Comisión Asesora de Evaluación integrada por los profesores: **Dr. Olivar Castejón**, C.I. N° **3.380.062**(Tutor); **Dra. Migdalia Medina**, C.I. N° **7.047.821**, **Dra. María de los Reyes Gamero**, C.I. N° **4.028.311**, de acuerdo a lo previsto en el Artículo N° 142 del Reglamento de los Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, decidió por unanimidad aprobar dicho proyecto.

En la ciudad de Valencia, a los 20 días del mes de Noviembre de Dos Mil Trece.

Comisión Coordinadora,

Dra. Xiomara González de Chirivella
Coordinadora

Dra. Guillermina Salazar de Dugarte
Miembro de la Comisión
Coordinadora

Dra. Migdalia Medina
Miembro de la Comisión
Coordinadora



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS**



**EVALUACIÓN A TRAVÉS DEL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO
DE LA INFECCIÓN POR VIRUS PAPILOMA HUMANO
EN UNA POBLACIÓN FEMENINA**

**Autora: HimánRichani
Tutor: Dr. Olivar Castejón**

Valencia, Junio 2014



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS**



**EVALUACIÓN A TRAVÉS DEL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO
DE LA INFECCIÓN POR VIRUS PAPILOMA HUMANO
EN UNA POBLACIÓN FEMENINA**

**Autora: HimánRichani
Tutor: Dr. Olivar Castejón**

Trabajo que se presenta ante la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias de la
Salud de la Universidad de Carabobo para optar al Título de
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS

Valencia, Junio 2014

DEDICATORIA

*A Dios Todopoderoso por darme la fortaleza y la luz
para no decaer en mis propósitos en todo momento.*

*A mi hijo Randy, que sirva como ejemplo, la
dedicación y perseverancia para el logro de sus
metas.*

*A mi esposo Nabih, por su gran ayuda siempre
incondicional.*

*A mis queridos Padres quienes con orgullo ven mi
crecimiento intelectual y el logro de mis metas.*

*A mi tío Kaled, reciente perdida, quien desde el cielo
me ayudará a conseguir esta meta tan costosa para
mí y que me ayude a disfrutar del éxito.*

*A mis hermanos y sobrinos a quienes amo, que sirva
esto como estímulo para seguirse proyectando
intelectual y espiritualmente.*

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma me ayudaron al logro de las metas propuestas a pesar de las adversidades.

A mi querido tutor Olivar Castejón, por su calidad humana, paciencia, dedicación y estímulo al compartir conmigo los momentos dulces y amargos en mi crecimiento intelectual para alcanzar el título de Doctor en Ciencias Médicas. Mil gracias.

A la Dra. Migdalia Medina quien con gran dedicación me ha apoyado y prestado su inigualable estímulo y ayuda para concluir esta investigación. Mi eterno agradecimiento.

Al maestro de maestros Dr. López Gómez, quién con sus años y experiencia sirve de estímulo a todos los doctorandos.

A mis compañeros de asignatura: Luisa Amelia Pino, Rubén Romero, José Ovelio Pacheco y autoridades de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo por su colaboración en la culminación y logro de la meta propuesta.

A mi amiga Alexandra, por la comprensión, ayuda incondicional y profesionalismo demostrado en el desarrollo de la presente investigación.

A mis pacientes, que representaron la muestra y fueron protagonistas del presente estudio, sin los cuales no hubiese sido posible obtener el logro de la propuesta. A ustedes, mi eterno agradecimiento.

INDICE GENERAL

	Pág
Dedicatoria.....	vii
Agradecimiento.....	viii
Resumen.....	xii
Summary.....	xiii
Introducción.....	1
 CAPITULO I. EL PROBLEMA.....	 4
1.1. Contextualización inicial.....	4
1.2. Objetivos de la investigación:.....	9
1.2.1. Objetivo General.....	9
1.2.2. Objetivos Específicos.....	10
1.3. Justificación.....	11
1.4 Alcance y delimitación del estudio.....	12
 CAPITULO II. MARCO TEORICO REFERENCIAL.....	 13
2.1. Antecedentes y estudios relacionados.....	13
2.2. Enfoque epistémico.....	30
2.3. Fundamentos teóricos en relación al virus.....	32
2.4. Aspectos éticos y legales de la investigación sobre el VPH en seres humanos	58
 CAPITULO III. MOMENTO METODOLOGICO.....	 64
3.1. Nivel y tipo de investigación.....	64
3.2. Población y muestra.....	64
3.3. Técnicas y métodos de recolección de datos.....	65
3.4. Técnicas de procesamiento y análisis estadístico.....	73
 CAPITULO IV. RESULTADOS.....	 75
4.1. Análisis y Discusión.....	87
4.2. Conclusiones.....	94
 CAPITULO V. APORTE EPISTÉMICO.....	 96
Protocolo de seguimiento y control.....	101
Referencias Bibliográficas.....	102
 ANEXOS.....	 110
A. Consentimiento Informado.....	111
B. Figuras.....	112

INDICE DE TABLAS

		Pág.
TABLA 1	Frecuencia absoluta y relativa de infección por VPH según el método diagnóstico empleado.....	75
TABLA 2	Comparación de resultados obtenidos empleando los métodos diagnósticos PCR y Biopsia.....	77
TABLA 3	Comparación de resultados empleando los métodos PCR y Colposcopia.....	78
TABLA 4	Comparación de resultados empleando los métodos PCR y Clínica.....	79
TABLA 5	Comparación de resultados empleando los métodos PCR y Citología.....	80
TABLA 6	Sensibilidad, especificidad e índice Kappa de los métodos diagnósticos para infección por virus de VPH en comparación con el método de PCR.....	80
TABLA 7	Frecuencia de tipos virales detectados.....	82
TABLA 8	Frecuencia de tipos virales detectados por grupos de edad	83
TABLA 9	Frecuencias absolutas de tipos de VPH presentes en las diferentes etapas de la investigación.....	86

INDICE DE GRAFICOS

		Pág.
GRAFICO 1	Frecuencia relativa de infección por virus de VPH según los diferentes métodos diagnósticos empleados. a, b, c: Letras iguales sin diferencia significativa en comparación con PCR y letras diferentes con diferencia significativa en comparación con PCR.....	76
GRAFICO 2	Sensibilidad y especificidad de los métodos diagnósticos para infección por virus de VPH en comparación con el método de PCR.....	81
GRAFICO 3	Frecuencia de tipos virales detectados.....	82
GRAFICO 4A	Tipos virales en sujetos de 24 años o menos.....	84
GRAFICO 4B	Tipos virales en sujetos de 24 años o más.....	85



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS**



**Evaluación a través del diagnóstico y seguimiento de la infección por
VirusPapiloma Humano en una población femenina**

Autora: HimánRichani
Tutor: Dr. Olivar Castejón
Año: 2014

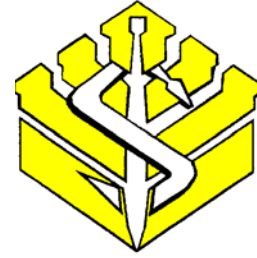
RESUMEN

La presente investigación se encuentra inserta en la línea de investigación Inmunología y enfermedades virales del programa doctoral y adscrito a la unidad de investigación CIADANA. Estudio abordado bajo el enfoque epistémico positivista, metodología empírico analítica, de nivel comparativo correlacional, de campo y corte longitudinal. La muestra utilizada fue de 110 pacientes, no probalística intencional, de una población de 270 pacientes que acudieron a consulta ginecológica privada; a dichas pacientes se les realizó diagnóstico clínico, citológico, colposcópico, biopsia y PCR para la detección del VPH. Los resultados obtenidos fueron: el PCR detectó el virus con una frecuencia del 90,9%, la biopsia 88,2%, la colposcopia 84,5%, la clínica y citología reportaron 57,3% y 40% respectivamente. La sensibilidad y la especificidad fueron mayor para la biopsia y colposcopia con 97%, 100% y 90% y 70% con diferenciación poco significativa. Contrariamente la citología resulto ser poco sensible 40% y especificidad 60%. Los virus de bajo riesgo 6 y 11 fueron significativamente más frecuentes que los de alto riesgo, 88% y 22% respectivamente. Se observó mayor frecuencia de infección por VPH de alto riesgo en el grupo de mayor edad (42%), siendo los más comunes los virus 31,53 y 45. Durante el control de seguimiento, el PCR fue negativo para la identificación del virus durante el post tratamiento y a los 6 meses, no siendo igual al año y año y medio, donde se detectaron 4 y 16 casos positivos de VPH (20%). De ellos, 2 fueron por el mismo subtipo viral diagnosticado inicialmente y 18% presentaron tipo de ADN viral diferentes. Esto se explica como una enfermedad residivante después del año o una reinfección.

Palabras Clave: VPH, diagnóstico, evaluación, seguimiento



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS



**Evaluation through diagnosis and monitoring of human papilloma
virus infection in a female population**

Author: Himán Richani
Tutor: Dr. Olivar Castejón
Year: 2014

SUMMARY

This research is embedded in the research and viral diseases Immunology and attached to the doctoral research unit CIADANA program. Study addressed under the positivist epistemological approach, empirical analytical methodology, comparative level correlational and longitudinal field. The sample was 110 patients, probabilistic not intentional, of a population of 270 patients attending private gynecology clinic; to these patients underwent clinical, cytological, colposcopic biopsy and PCR for the detection of HPV. The results obtained were: the PCR detected the virus with a frequency of 90.9%, 88.2% biopsy and colposcopy 84.5%, clinical and cytological reported 57.3% and 40% respectively. The sensitivity and specificity were higher for biopsy and colposcopy with 97%, 100% and 90% and 70% with little significant differentiation. Contrary cytology turned out to be very sensitive 40% and specificity 60%. The low-risk virus 6 and 11 were significantly more frequent than those at high risk, 88% and 22% respectively. Higher frequency of HPV infection in high-risk older group (42%) was observed, the virus 31, 53 and 45 being the most common. During the tracking control, the PCR was negative for virus identification during post treatment at 6 months, not being equal to the year and a half, where 4 and HPV 16 positive cases (20%) were detected. Of these, 2 were from the same viral subtype initially diagnosed and 18% had different types of viral DNA. This is explained as a residivante disease after year or reinfection.

Keywords: HPV diagnosis, evaluation, monitoring.

INTRODUCCIÓN

El Virus Papiloma Humano (VPH) constituye un problema de salud pública en la actualidad y es el principal responsable de las neoplasias epiteliales escamosas de origen viral en la población femenina menor de 35 años (1).

La infección causada por el virus papiloma humano (VPH) ocurre comúnmente en los humanos, debido a que estos virus tienen distribución mundial y se asocian, a una gama muy amplia de enfermedades que van, desde las verrugas cutáneas hasta cáncer genital. Desde los años 60 se ha observado un incremento en las verrugas de transmisión sexual o condilomas acuminados, estimándose que la prevalencia de las verrugas de transmisión sexual es de 5 a 20% en la población sexualmente activa se han detectado algunos factores de riesgo asociados entre los cuales están: la promiscuidad sexual, bajo nivel socioeconómico, multiparidad y algunos grupos de pacientes inmunodeprimidos como son los enfermos de síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o los pacientes sometidos a terapia inmunosupresora debido a trasplantes de órganos, presentan mayor prevalencia de infecciones por virus papiloma humano (VPH) que la población general (2).

Algunos autores señalan que este virus está presente en el 30% de los tumores malignos de origen cérvico uterino en los países en desarrollo, constituyendo esta la segunda causa de muerte en mujeres en edad fértil (3). En los Estados Unidos de

Norteamérica se reportan 1300 casos nuevos de cáncer de cuello uterino y 4.500 casos de muerte por esta infección (4). En Venezuela se estima que 60% de la población tiene el virus y el cáncer de cuello uterino constituye la primera causa de muerte por esta patología en el país (5).

En razón a lo expuesto y a la importancia de la temática en estudio, la presente investigación está orientada por el paradigma cuantitativo, el cual se caracteriza por un momento metodológico empírico analítico. Utilizando encuestas tipo registro de historias clínicas, donde se tomaron datos sobre los diagnósticos aplicados, en los pacientes con signos sugestivos en genitales externos e internos, de Virus Papiloma Humano (VPH); observación de los casos evaluados pos-tratamiento y seguimiento de ellos, mediante controles semestrales por reacción en cadena polimerasa (PCR), durante año y medio en el período comprendido entre Diciembre 2006 a Diciembre 2011.

Finalmente debemos añadir que este trabajo de investigación está estructurado de la siguiente manera: **Capítulo I**, en este aparte se presenta la Contextualización del Problema en Estudio, donde se expone el propósito, justificación y delimitación del mismo. **Capítulo II**, denominado Marco Teórico Referencial, presenta antecedentes referenciales y referencias teóricas de la investigación. En el **Capítulo III**, se exponen los Momentos Metodológicos. El **Capítulo IV**, cuyo contenido son los Resultados del estudio, representados en tablas y gráficos con sus respectivos análisis; igualmente

se presentan la discusión, conclusiones. En último lugar, en el **Capítulo V**, se presenta el aporte epistémico; para concluir con las referencias bibliográficas y anexos.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1. Contextualización inicial

El Virus Papiloma Humano (VPH), representa hoy un problema de salud pública en la población femenina, siendo éste el principal responsable de las neoplasias epiteliales escamosas de etiología viral en mujeres menores de 35 años, constituyendo además la segunda causa de muerte por neoplasias intraepitelialescervico uterinas en la población mundial donde 500.000 mujeres mueren al año por esta causa (1).

El virus está presente en 30% de los tumores malignos de origen cérvico uterino en los países en desarrollo, constituyendo esta la segunda causa de muerte en el mundo observada en mujeres en edad fértil (3). Otros autores reportaron anualmente 1.300 casos nuevos de cáncer de cervix en los Estados Unidos de Norteamérica y 4.500 muertes por esta afección. En países en vías de desarrollo como México, Perú y otros de América Latina, las neoplasias intraepiteliales, constituyen actualmente un problema de salud pública y representa la primera causa de muerte (4). Rodríguez, refiere que en los Estados Unidos aproximadamente 15%

de la población está infectada y que anualmente se registran cerca de 6,2 millones de nuevos casos. En Venezuela, se estima que 60% de la población está infectada por el virus y el cáncer de cuello uterino representa la primera causa de muerte en el país, aún por encima del cáncer de mama (5).

Aproximadamente, 75% de la población femenina contrae alguna vez en su vida una infección por el papiloma virus (VPH), lo cual constituye una de las infecciones de transmisión sexual (ITS) más frecuentes y aun poco conocida (6). La infección viral suele manifestarse una vez que ha ocurrido el contacto con el virus, expresándose la infección clínica, sub-clínica o latente dependiendo de la etapa clínica en que se manifieste el virus. En **la infección clínica** la enfermedad se manifiesta con expresión activa, que cursa con lesiones papulares o verrugosas, es decir, lesiones visibles a simple vista y sus manifestaciones oncogénicas dependerán del ADN viral. **La infección sub-clínica** es aquella con expresión mínima, sintomática, que solo se diagnostica por lesiones acético positivas a través del colposcopio. En **la infección latente** no se evidencia anormalidad morfológica en el epitelio escamoso y el virus sólo puede ser detectado por técnicas especiales en virología y biología molecular (7).

En la literatura se reporta que en la etapa sub-clínica además de evidenciarse por técnica de reforzamiento óptico, histológicamente, también existe la evidencia de infección viral, traducida por coilocitosis, mientras que en la fase latente, la carga

viral es tan baja que impide al virus replicarse y carece de significación biológica, controversia que continua sin resolverse; por lo que el papel patogénico de la infección viral latente continua generando una intensa discusión, pudiendo demostrarse la presencia del virus a través de técnicas de alta sensibilidad como el PCR (8). Se han diagnosticado más de cien tipos de VPH por diferenciación de su ADN, se dice que treinta de ellos afecta el área genital (6).

Siendo el VPH uno de los grupos vírales más frecuente en el mundo; el cual afecta epitelios escamosos de piel y mucosas ocasionando lesiones, algunas de tipo benignas como las verrugas genitales que se vinculan por lo general con los tipos de VPH 6 y 11, los cuales producen lesiones de bajo riesgo, existiendo otra variante que se transmite por vía sexual, considerada de alto riesgo, y están representados por los tipos 16 y 18 (más frecuente), 31, 33, 45; siendo los dos primeros (16 y 18) responsables más frecuentes del cáncer cérvico-uterino (9).

Estudios recientes indican que dichos virus podrían asociarse e incriminarse con las neoplasias de la mucosa oral. Se conoce que los virus son microorganismos que por sí solos no actúan, es decir, no son activos en términos metabólicos como lo son las bacterias; ellos requieren de una célula huésped para funcionar y poder reproducirse, invadiendo a la misma, produciendo lisis celular y así continuar su ciclo reproductivo y de actividad (9).

El virus produce lesiones en los epitelios planos estratificados, estando la estructura histológica de los mismos, constituida por diversos estratos y células, entre ellas los Queratinocitos células más abundantes del epitelio escamoso, células de Langerhans, Melanocitos y células de Merkel, estando representados los diferentes estratos celulares por el estrato basal, espinoso, granuloso y corneo (10).

Conjugados esos aspectos histológicos con el comportamiento viral en la célula huésped: *Queratinocito*, caracterizado por ser una célula migratoria en el epitelio, la cual se muestra susceptible a la invasión por parte del virus mediado por receptores denominados integrinas y que explican en parte la afinidad del virus por esta células, surgieron las siguientes inquietudes: ¿Tendrá alguna relación, el comportamiento migratorio del queratinocito con las fases de infección clínica del virus?. A la luz de los conocimientos actuales en biología molecular ¿Cómo se explica el mecanismo de replicación del virus en la fase latente, si su expresión es mínima e inactiva biológicamente?, ¿Cómo la infección viral latente presentada en portadores sanos puede ser capaz de transmitir la enfermedad, cuando el virus en teoría , no es biológicamente activo?, ¿Existirá alguna relación entre la infección viral latente y las técnicas habituales empleadas en ginecología para, diagnosticar y evaluar al virus?, ¿Es latente el comportamiento viral ó se trata de una residual o recidivante o de una reinfección?.

Solo se ha logrado determinar en la etapa de latencia, hasta el momento partículas vírales a nivel celular, que favorecen la inmunidad mediada por células. En relación con lo antes expuesto se planteó un estudio donde se observa incertidumbre y existen aún muchas interrogantes, que habrían que ordenar e integrar para comprender aspectos fisiopatológicos del virus y quizás así entender el porqué del comportamiento latente o no del virus, ya que en esta etapa de la infección, el individuo infectado se comportaría como un portador sano, quien estaría involucrado con la diseminación del virus, incrementando la infección por éste y sus implicaciones. Por lo que resultó interesante evaluar a través del diagnóstico y seguimiento la infección por Virus Papiloma Humano, en una población femenina, en el presente estudio; lo que constituye un verdadero e interesante aporte al conocimiento y manejo de esta patología.

Con los nuevos avances en tecnología molecular alcanzados en los últimos 20 años lo que permitió aproximaciones al conocimiento de la interacción virus/huésped; se han incentivado las investigaciones al respecto siendo el campo de la Ginecología, la Dermatología, la inmunología, la anatomía patológica, microbiología, odontología, bioética y la biología molecular los más estudiados (11).

En vista del avance de la tecnociencia y las múltiples disciplinas involucradas en el aporte al conocimiento del comportamiento de la interacción virus huésped, se evidencian las múltiples aristas del fenómeno, el cual implica diversos campos de

investigación aun no explorado lo cual determina la complejidad del fenómeno en estudio con lo que se pretende generar un aporte epistémico a través de la evaluación de la infección que permita comprender la fase de latencia del virus utilizando para ello el aporte y apoyo del conocimiento de algunas de las disciplinas antes mencionadas constituyéndose esto en un punto de partida, para un nuevo enfoque en el diagnóstico, tratamiento, evaluación y seguimiento de la infección viral; contribuyendo a una posible solución para esta afección.

Con base a este planteamiento se formulan los objetivos que guían esta investigación.

1.2. Objetivos de la Investigación

1.2.1. Objetivo General

Planteada la complejidad diagnóstica, clínica y epidemiológica que conforman el comportamiento epitelial del Virus Papiloma Humano, se propone como guía que orienta esta investigación, **“Evaluar a través del diagnóstico y seguimiento la infección por Virus de Papiloma Humano en una población femenina”** que asistió a una consulta privada ginecológica en Valencia, Edo. Carabobo durante el período Diciembre 2006 a Diciembre 2011, con la finalidad de generar un aporte teórico que explique la infección por el virus en sus diferentes etapas clínicas y objetivadas por

controles periódicos, a través de la prueba de biología molecular: reacción en cadena polimerasa (PCR).

1.2.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la sensibilidad y especificidad de cada uno los métodos diagnósticos empleados para la determinación de la infección por VPH de la población en estudio en la fase diagnóstica.
- Determinar los tipos de ADN viral y la frecuencia detectada durante la fase diagnóstica
- Establecer la relación entre los sub tipos virales reportados según grupo etario.
- Detectar la presencia del virus durante el post tratamiento y en la etapa de seguimiento a través de la técnica de biología molecular PCR.

1.3. Justificación

Cada año se detectan en el país tres mil nuevos casos de cáncer de cuello uterino asociada a Virus Papiloma Humano en mujeres con edades comprendidas entre 25 y 64 años, siendo esta afección frecuente y constituyéndose en una de las primeras causas de muerte oncológica en las mujeres venezolanas. Entre los factores que propician la progresión de la enfermedad hacia el cáncer cérvico-uterino esta la persistencia de la infección y la habilidad que posee el virus de expresar determinados genes por tiempo prolongado, independientemente de que la infección tenga o no manifestaciones clínicas (12).

Por todo lo antes expuesto, en este sentido se justifica la presente investigación, desde el punto de vista médico ya que el estudio aportará elementos que permitirán la búsqueda de un nuevo enfoque diagnóstico y de seguimiento de esta afección, para un mejor control de esta enfermedad y del problema de salud pública existente. Además, podría aportar posibles soluciones en el abordaje, tratamiento de la infección viral y control del riesgo de desarrollar cáncer de cuello uterino, lo que representa cambios en el manejo de técnicas habituales, generando con todo ello nuevos aportes a la ciencia.

Desde el punto de vista científico este estudio permitirá la apertura de nuevas líneas de investigación en relación a este tema tan controversial.

1.4. Alcance y delimitación del estudio

El presente estudio se realizó en una población femenina con sospecha clínica de VPH, en genitales externo y/o internos, con edades comprendidas entre 16 y 55 años de edad a quienes se les aplicó un protocolo diagnóstico basado en la clínica, colposcopia, citología, biopsia y reacción en cadena polimerasa (PCR), que asistieron a una consulta privada de Ginecología y Obstetricia, en Valencia, Edo. Carabobo.

La misma está enmarcada en la línea de investigación: Inmunología y enfermedades virales, del programa doctoral adscrito al Centro de Investigaciones y Análisis Docente Asistencial, Núcleo Aragua (CIADANA).

El mismo se ejecutó en el período comprendido entre Diciembre 2006 a Diciembre 2011. Estuvo dirigido a profesionales e investigadores en Ciencias Médicas en la Especialidad de Ginecología y Obstetricia y a la población en general.

El estudio tiene como alcance despertar en estos profesionales la motivación de promover la búsqueda de soluciones hacia una praxis más efectiva en el diagnóstico, tratamiento y control del VPH; al igual que se buscó incentivar a otros profesionales para lograr una mejor prevención al respecto. Igualmente, los hallazgos derivados de esta investigación permitirán comprender la infección del VPH con una visión más amplia e integrada.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

2.1. Antecedentes y estudios relacionados

Las investigaciones sobre el Virus Papiloma Humano son muy diversas y en especial orientadas a los factores de riesgos asociados a la infección, más recientemente y a la luz de los adelantos en histopatología y biología molecular se han planteado nuevos aspectos a investigar en especial a todo lo relacionado con tipificación del genoma viral, su correlación clínica e histopatológica así como la asociación de los serotipos con cáncer de cuello uterino. En la actualidad, las investigaciones se han enfocado hacia el área de la prevención y pronóstico de la enfermedad a través de la identificación de marcadores inmunológicos, sin embargo, se ha observado a través de diversos registros bibliográficos, poca o ninguna información acerca de la evaluación de la infección viral a través del diagnóstico y seguimiento de casos por un período prolongado de año y medio.

Los trabajos presentados a continuación en el ámbito internacional y nacional respectivamente, guardan relación con los diversos aspectos abordados en esta

investigación, por lo tanto sirvieron como fuente de información y aportes al marco referencial del fenómeno en estudio.

El trabajo “Variantes Moleculares del Virus Papiloma Humano (VPH) tipo 16 y 18 en adenocarcinoma de cérvix”, donde se concluye: los serotipos 16 y 18, son considerados carcinógenos humanos habiéndose demostrado la asociación etiológica entre la infección por ellos y el adenocarcinoma del cuello por PCR(13).

Otros autores relacionaron el despistaje de cáncer cervical, la prevalencia del tipo de VPH de alto riesgo con la edad en mujeres con citología normal, observándose diferentes genotipos del virus en muestras cervicales donde las secuencias de VPH positivo encontrados fueron: el tipo 16 y 18 y las edades con mayor prevalencia fueron entre 25-29 años (14).

En otra investigación, Viral Latency – The Papilloma Virus Model, el estudio se basó en la prevalencia y la historia natural de las infecciones por Virus Papiloma, donde se monitoreo el ADN viral del VPH como consecuencia de la inmunosupresión, con la expectativa de que las infecciones virales latentes podrían reactivarse y ser detectables. La población en estudio consistió en mujeres que se encontraban con insuficiencia renal terminal y otras que tenían VIH/SIDA; a quienes se les realizó tomas de muestras cérvico vaginales para observar excreción del virus a través del tracto genital inferior, con intervalos para las tomas de muestras de seis

meses a través de PCR, identificándose infecciones simples y múltiples y la determinación de los genotipos virales. De las 225 mujeres que tenían VIH, 177 (79%) fueron VPH positivas y 111 (49%) tenían varios tipos de VPH, es decir, tipos mixtos. Siendo el tipo 6 el más común. Los otros tipos virales detectados, fueron 45, 52, 53, 54, 58 y 74 como los más frecuentes, a diferencia de los reportados para la población en general que son el 11, 16, 18, 31, 33 y 35. Además se observó que la prevalencia del VPH en la cohorte de las pacientes nefropatas terminales, fue ligeramente inferior a los de la cohorte con SIDA. Concluyéndose que las infecciones por VPH son comunes y normalmente se producen en el estado sub-clínico de un sistema inmunológico funcional y podría ser reactivado por condiciones inmunosupresoras, surgiendo la incertidumbre de cómo distintos tipos persisten en una población y puedan aislarse en varias ocasiones a partir de muestras recogidas; lo que plantea cuestiones complejas relativas a la naturaleza de la transmisión viral y a la reproducción (15).

Otro estudio fue El Virus Papiloma Humano en la Displasia Cervical donde se estudiaron 129 pacientes con diagnóstico positivo por citología y colposcopia de infección por VPH, se demostró que el grupo etario donde predominó la infección estuvo comprendido entre los 20 y 35 años, observándose en dicho grupo que las primeras relaciones sexuales fueron antes de los 20 años. Al comparar el grado de sensibilidad entre ambos métodos diagnósticos se observó que la colposcopia tuvo un

nivel de sensibilidad y especificidad mayor que la citología en el diagnóstico de lesiones cervicales por el virus (16).

En el trabajo “Incidencia de los diferentes tipos de papiloma virus (VPH) en las lesiones escamosas del cuello uterino”, cuyo objetivo fue determinar los tipos de VPH, asociados a lesiones escamosas intraepiteliales de bajo y alto riesgo por PCR, se detectó que dichas lesiones y los carcinomas invasores fueron positivos para el tipo 16, por lo que sugirieron realizar la técnica de PCR complementaria a las biopsias cervicales de lesiones sospechosas por VPH (17).

Otro trabajo internacional donde se estudió el comportamiento de algunos factores de riesgo asociados a la aparición de lesiones precancerosas de cuello uterino, allí se trató de establecer la relación entre el factor de riesgo y la enfermedad, se observó que el grupo etario más afectado correspondió a las edades comprendidas entre 35 y 59 años (52,85%) demostrándose la existencia de asociación entre lesiones precancerosas del cervix y factores de riesgo como: multiparidad, promiscuidad, infección por VPH, inicio precoz de relaciones sexuales. Además se comprobó que la lesión precancerosas más frecuentemente encontrada fue la neoplasia intraepitelial cervical I (NIC I) (18).

Otra investigación que tuvo como objetivo determinar la frecuencia y distribución del VPH en los diferentes estadios que conforman la historia natural del

cáncer cérvico-uterino para optimizar la detección del mismo con el uso de diferentes métodos diagnósticos y oligonucleótidos del PCR universales y específicos; utilizando una muestra de 154 mujeres en Ciudad de México, en un estudio descriptivo y transversal donde se realizó un análisis con T de Student para valores continuos y chi cuadrado, para proporciones y análisis de concordancia entre biopsia y exudado cervical o citología con índices de kappa y detección del VPH por PCR. Los resultados obtenidos por diagnóstico citológico fueron: 65 casos (42%) normal, 45 casos (29,2%) de citologías positivas a lesiones de alto y bajo riesgo y 44 casos reportados por citologías (28,6%), fueron cáncer invasivo (19).

El VPH fue detectado en 95,5% de los casos que tenían cáncer invasor y en 91,6% se observó lesiones de alto grado, las lesiones de bajo grado se detectaron en el 66,7% y en citologías consideradas normales se determinó VPH de bajo riesgo en el 23,1% por diagnóstico mediante PCR. La detección del VPH fue más eficiente en las muestras obtenidas por biopsia que por citología cérvico vaginales, concluyen que la presencia de VPH de alto riesgo es elevada en el epitelio cervical de mujeres con diagnóstico citológico normal y que la detección del mismo mejora al utilizar distintos juegos de oligonucleótidos universales que reconozcan la región L1 del VPH por PCR (19).

Un estudio realizado en España, publicada en una revista de salud pública en México, cuyo objetivo fue identificar la infección por VPH de alto riesgo en 166

mujeres, a quienes se les tomó muestras cervicales mediante la evaluación de tres técnicas para la detección del virus: a) PCR-EIA, usando consensos MY09, MY011. b) PCR- con line blot hybridization (PCR-LBH) y c) híbrido de captura 2. Obteniéndose como resultado que el ADN viral se reconoció en 29,5%; 25,3% y 24,7% respectivamente en las técnicas empleadas. Las diferencias entre ellas para identificar al virus no fueron estadísticamente significativas. La concordancia global entre los tres ensayos fue 122/166 (73,5%), obteniéndose un índice de kappa de 0.59 ($p < 0.00$) para la comparación entre PCR-EIA y PCR-LBH y de 0.57 ($p < 0.00$) para PCR-LBH y HC2; lo que reflejó concordancia entre los ensayos para reconocer muestras positivas y negativas, lo cual indicó que los mismos no difirieron de la detección de muestras positivas, ya que fue similar en los tres tipos de técnicas diagnósticas (20).

En otro estudio internacional donde se revisó la carga vírica de cánceres asociados al VPH en América Latina en 5400 casos donde murieron 2.663 mujeres por cáncer de cuello uterino en el 2002, se determinó una tasa de mortalidad de 7 mujeres diariamente por esta causa. Se identificó al VPH como principal agente etiológico en estos tipos de cánceres; esta situación obligó a establecer prevención primaria con la introducción de vacunas profilácticas y prevención secundaria a través de pruebas de detección de VPH en los programas de tamizaje por la alta frecuencia de cáncer encontrado; ejemplo de ello se citan los sitios más frecuentes donde se localiza el virus en este tipo de cáncer en América Latina: cuello uterino

100%, vagina 65 a 90%, vulva y pene, 40%; ano 90%, orofaringe 30%, cavidad oral y laringe 10%(21).

En un estudio realizado en Andalucía, España en 2794 muestras de endocervix, donde 951 (35%) se detectó algún tipo de VPH, de ellos 834 casos (30%) se tipificó como VPH de alto riesgo y 117 (4%) se localizó VPH de bajo riesgo, destacándose que en 1798 mujeres estudiadas (65%) no se observó ningún genotipo de VPH. Los tipos de alto riesgo más prevalentes fueron: VPH 16 con 12,8%, seguido del 31 y 59 con 12,6% y 6,5% respectivamente (22).

En Centro América, la investigación cuyo objetivo fue identificar lesiones de VPH en un grupo de pacientes masculinos, cuyas parejas sexuales presentaban lesión intraepitelial cervical de bajo grado asociada al Virus Papiloma Humano (VPH), con confirmación mediante PCR-ADN. El estudio incluyó 100 hombres entre 21-45 años, los resultados observados por penoscopia fueron: Papilomatosis 40% de los casos, verrugas vulgares 24%, papilomatosis en placa 6%. La citología uretral arrojó los siguientes resultados: Coilocitosis 58%, inflamación 44% e infección agregada 60%. La infección bacteriana inespecífica estuvo presente en 8%, infección Bacilar en el 10%, infección mixta 12%, cambios sugestivos por *GardnerellaVaginalis* 24% y *Chlamydia trachomatis* 6%. Además se observó disqueratosis en 47% de los casos. Se concluyó que el VPH de alto riesgo se asoció mayormente con lesiones peneanas y evidencia de coilocitosis en las citologías, por lo que se recomendó a los compañeros

sexuales de mujeres con VPH realizarse de rutina penescopia y citología uretral para diagnóstico y tratamiento precoz (23).

En un trabajo donde se analizan 45 muestras de biopsias de lesiones cervicales en mujeres cubanas, en quienes se determinó la presencia de 20 tipos de VPH mediante PCR con cebador específico, encontrándose 91% de positividad al VPH; siendo el genotipo más frecuente de alto riesgo el 18, 45, 31,39, 51,56 y 59; no encontrándose los subtipos de bajo riesgo 6 y 11 en ninguna de las muestras. Afirmándose que estas lesiones ocupa el 2do lugar de incidencia y el 4to de mortalidad entre las enfermedades malignas que afectan el tracto genital femenino en Cuba (24).

Otra investigación realizada donde se estudiaron 60 pacientes para realizar una correlación cito-colpo-histológica de lesiones causadas por el Virus Papiloma Humano, se observó que la edad promedio de las pacientes fue de 30.95 años, con mayor cantidad de pacientes en el rango etario de 21 a 25 años, y se tomó como método gold estándar a la biopsia, se observaron como resultados 70% (42 casos) de la citologías negativas y 48 pacientes con (80%) biopsias positivas y 16 casos con PCR positivos que fueron realizados en aquellas pacientes con hallazgos anormales en citologías o colposcopias, concluyendo que se obtuvo una alta especificidad al Papanicolaou con respecto a la biopsia, no así en comparación con el PCR,

sensibilidad 56% y error de 50%, debido al número pequeño de pacientes que se sometieron a este estudio (25).

Entre los aportes revisados a nivel nacional y regional, se citan respectivamente Milgron et al, quienes realizaron un estudio sobre Infección vaginal por el Virus Papiloma Humano, donde se estudiaron 25 mujeres con lesiones papilares de vagina en el Servicio de Ginecología y Reproducción Humana del Hospital “Carlos J. Bello” y “Luis Razetti”, entre octubre de 1996 y diciembre de 1997. Tomaron dos muestras de dichas lesiones, una de ellas para determinar la presencia de algunas de las secuencias de ADN viral, asociadas a los tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 ó 35 mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa y la otra fue procesada por anatomía patológica según la metodología tradicional. Once muestras del total de pacientes estudiadas coincidieron con el diagnóstico histopatológico sugestivo de infección por el virus (44%). En ocho de las muestras estudiadas que representaron (32%), se encontró la presencia del ADN asociados a los tipos de virus antes referidos y en las tres restantes fue negativo el PCR. Seis casos (75%) resultaron infectados por virus de bajo riesgo; 1 caso (12,5%) por los tipos de riesgo intermedio y de alto riesgo 1 (12,5%) respectivamente (7).

Una muestra de 48 pacientes con sospecha clínica citológica y/o histopatológica de VPH, a quienes se les realizó PCR para detección del virus, encontrándose 79% positivo, cuyos genotipos más comunes fueron: 11 (BR) 26%, 33

(AR) en 23%, 6 (BR) en 5,7%, presentó infección mixta una paciente pero solo se pudo identificar el VPH tipo 11. Predominaron los tipos de riesgo intermedio y de alto riesgo 52,6%, con respecto a los de bajo riesgo que representaron un 44,7%. Se concluyó que la PCR detectó mayor número de mujeres con VPH, que la citología y que el VPH de riesgo intermedio y alto se observó más frecuentemente en mujeres asintomáticas (26).

El estudio, cuyo objetivo fue asociar cepas de VPH determinadas por PCR, con las características de las células infectadas. La muestra estuvo conformada por 55 biopsias cervicales, sugestivas de VPH. Observaron: 21,82% de falsos positivos en las biopsias cervicales. El genotipo de VPH que apareció con mayor frecuencia fue el 11 (30,23%), observándose un predominio de bajo riesgo oncogénico (46,51%), representado por el VPH-11 y 13,95% de las de alto riesgo, representado por el tipo 16. En el 20% de las muestras observaron NIC; 9,09% NIC I y NIC II 5,45%, predominando ambos en los casos VPH negativos. El NIC III representó 5,45% y apareció solo en casos positivos a VPH. La atipia coilocítica y la acantosis fueron características constantes en todas las muestras, por lo que se consideraron hallazgos no específicos. 78,18% presentaron paraquetosis, siendo éste un hallazgo predominante en las muestras positivas, 72,73% presentaron binucleación y 69,09% micropapilomatosis. Concluyeron que deben utilizarse criterios histopatológicos más específicos para el diagnóstico de VPH, ya que no existen características comunes

presentes en todas las células infectadas por una cepa específica que permitan predecir el tipo viral presente en la muestra (27).

La investigación realizada en la Maternidad “Concepción Palacios sobre: “Tipificación del virus de papiloma humano y su correlación en la transmisión perinatal”, en el cual se estudiaron 25 mujeres embarazadas con citologías sugestivas de infección por VPH, realizándose PCR a las madres y a los recién nacidos, detectándose el VPH 6 en 60% de los casos, 18,8% otros tipos de VPH, 24% de los PCR fueron negativos. El tipo 6 se identificó en 3 neonatos de 15 madres con el mismo genotipo, lo que representó la transmisión de este tipo viral en 20% y el tipo 18 se identificó en un neonato, de 2 madres con el mismo tipo, identificándose una transmisión para el 18 de 50% (28).

En “Detección del Virus Papiloma Humano en pacientes jóvenes, de la Universidad Central de Venezuela”, trabajo cuyo objetivo fue determinar la presencia y tipo de VPH en pacientes jóvenes con diagnóstico clínico e histopatológico de VPH y/o neoplasia intraepitelial cervical mediante PCR e hibridación. En 133 pacientes femeninas con edad promedio de 25 años (rango de 16-35 años). El 50% de las pacientes tuvieron dos o más parejas sexuales. En ellas se detectó el genoma viral en 48,87% (65/133) de la población estudiada. El análisis del tipo viral mostró que el 69,23% (45/65) presentó VPH de alto riesgo (AR), el 6,15% (4/65) correspondió a VPH-BR. La asociación entre la histopatología y la presencia del virus demostró que

el mayor porcentaje correspondió a lesiones de bajo grado (LIEbg) 75,38% (49/65); 24,62% (16/65) manifestó lesiones de alto grado (LIEag)(29).

En el estudio sobre “Correlación clínica e histopatológica en lesiones producidas por VPH en parejas”, donde la muestra fue de 50 parejas con lesiones clínicas o hallazgos sugestivos de VPH, por citologías y biopsias; encontrándose que las edades promedio fueron 32 años para las mujeres y 36 para los hombres, el promedio de parejas sexuales osciló de 2 parejas para las mujeres y 5 para los hombres. El uso de preservativos solo se observó en un 6% de las parejas. Otro factor de riesgo investigado fue el hábito tabáquico, observándose presente en 22% de las mujeres y en 20% de los hombres de la muestra estudiada. En los resultados de las biopsias se observó: cambios histopatológicos por VPH, en pene 99%, en vulva 98% y 68% en cuello uterino con 13% NICI, 8% NICII y 11% NICIII. Concluyendo que el VPH debe ser diagnosticado en pareja para un mejor control del tratamiento y seguimiento (30).

Otra investigación donde se estudiaron 28 casos con diagnóstico de VPH por colposcopia y/o PCR, utilizando para ello, criterios de inclusión como himen intacto, ausencia de relaciones sexuales superficiales e hijos de madres portadoras del virus. En dicho estudio observaron que el grupo etario predominante osciló entre 13 a 17 años (43,43%), 89,29% estuvo representado por el sexo femenino y 10,71% por el masculino. Los hallazgos colposcópicos más frecuentes fueron condilomas en vulva y

meato uretral. Lesiones menores de 10 mm en meato uretral que representaron 35,71%; similarmente condilomas en vulva menores de 10 mm 21% de los casos. Los serotipos más frecuentes fueron el 11(32,14%) y 25% para el tipo 6. El motivo de consulta más significativo fue la leucorrea (39,29%) confirmándose a través de este estudio la transmisión por contacto indirecto(fomites)autoinoculación y transmisión madre/feto (31).

En otra publicación,estudiaron la asociación entre neoplasia intraepitelial cervical e infección por virus papiloma humano en 124 casos de pacientes con VPH del 2001 al 2002, a través de estudios citológicos, colposcopicos y biopsia; encontrándose que la citología reportó VPH en solo 26,61%, la atipia colposcópica más frecuente fue el epitelio aceto blanco en 42,74% (etapa subclínica). La biopsia mostró NIC asociado a VPH 32,24%, evidenciaron VPH en 74% de los casos, el tipo más frecuente fue el de riesgo intermedio (41,12%). Los NIC estuvieron asociados a VPH de riesgo intermedio y alto en 92,5% y 7,5% con los de bajo riesgo, por lo que concluyeron que todos los tipos de VPH pueden asociarse a NIC, pero con menor frecuencia a los de bajo riesgo (32).

El estudio sobre “Diagnóstico del virus papiloma humano en cuello uterino de mujeres que acudieron a la consulta anual citológica”, realizaron la detección y tipificación de VPH por PCR en 58 mujeres asintomáticas en un centro asistencial preventivo; reportaron que 20 de 58 casos fueron positivos por PCR al VPH lo que

representó 34,5% en relación a la citología, donde solo se identificó 18,2% de casos positivos al VPH, siendo los más frecuentes los de riesgo intermedio tipo 45 (actualmente clasificado de alto riesgo) para infección por VPH, 42,9% fueron de bajo riesgo los tipos 6 (38,1%) y los de alto riesgo con una frecuencia del 19% identificándose en este grupo el genotipo 16. Además observaron que los factores relacionados con la infección como: multiparidad, relaciones sexuales precoces, promiscuidad, hábitos tabáquicos, etc., no fueron estadísticamente significativos (33).

La investigación titulada “Virus del papiloma humano en lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) de cuello uterino. Tipificación y ultraestructura”, como metodología refirieron que tomaron muestras de cérvix a 56 pacientes de la consulta de patología del cuello uterino en un Ambulatorio del Edo. Aragua, para estudiar PCR por biopsia fresca con buffer lisis, a fin de detectar y tipificar VPH. Realizaron además biopsias dirigida para ser preparadas y observadas en microscopia electrónico donde observaron los siguientes resultados: 69,3% de las muestras fueron diagnosticadas como LIE de bajo grado por citología y 30,7% eran LIE de alto grado, 23,2% de las muestras tuvieron resultados positivos de VPH por ADN viral y 76,7% negativo para ADN del VPH, la tipificación fue 6 y 11 en las lesiones de bajo riesgo y el tipo 16 en lesiones de alto riesgo. Ultra-estructuralmente se observó en LIE (AG) positivas al VPH, gránulos de lipofuscina, figuras mielinicas, mitocondrias alteradas, alteración de la continuidad de la membrana nuclear de las células del endotelio vascular y fibrina. En los LIE (AG) negativos para VPH se observó: figuras

mielinicas, mitocondrias alteradas, alteración de la membrana endotelial y presencia de mastocitos(34).

En otra investigación realizada en 100 pacientes a quienes les practicó citologías cervico-vaginales, Colposcopia, vulvoscopia y biopsia de las zonas con lesiones macroscópicas y/o con cambios colposcópicas, concluyeron: La edad promedio del grupo en estudio fue de 37 años, la edad para el inicio de relaciones sexuales fue de 17 años, 31% de los pacientes eran fumadores, 36% presentaron antecedentes de patologías cervicales asociadas, 66% se observó patología vaginal dada por VPH, 55% tuvieron patología cervical asociada al virus y 61% presentaron VPH en vulva, notándose un incremento de lesiones por VPH en vagina y vulva, en relación con otras investigaciones (35).

Un estudio realizado a 1648 informes citológicos en Los Teques, Edo. Miranda, a trabajadoras sexuales y usuarios de los Servicios de Planificación Familiar en el 2007, cuyo objetivo fue el de comparar la prevalencia de lesiones intra epiteliales escamosas y de infecciones en la citología cervical en el cual se observó que en las trabajadoras sexuales había mayor prevalencia de Gardenella Vaginal, seguido de Cándida y Tricomona Vaginal con un porcentaje de 51%, 5,6% y 5% respectivamente y solo 2,2% para la infección por VPH, mientras que para las usuarias fue de 35,9%; 8,6%; 3,3% y 0,5% respectivamente (36).

Un trabajo donde se procesaron por PCR 70 muestras citológicas del área genital, se detectaron 31 casos positivos a VPH, de ellas 29 casos fueron de bajo riesgo tipos 11 y 6, un caso con infección mixta tipos 6 y 33 y otro de alto riesgo tipos 18 y 33. Se concluyó que los resultados obtenidos ponen de manifiesto la utilidad de la PCR para el diagnóstico y tipificación del VPH (37).

En el estudio detección y tipificación del Virus Papiloma Humano (VPH), mediante PCR-RFLP, el cual tuvo como objetivo estandarizar una técnica de PCR para la detección y tipificación del VPH en mujeres con diagnóstico clínico previo del virus. Fue un estudio descriptivo, de corte transversal, donde se procesaron 189 muestras en mujeres que acudieron para la extracción de ADN en genitales para su diagnóstico y tipificación por técnicas de PCR-RFLP, realizado en Mérida, Edo. Mérida. Los resultados obtenidos fueron: en 16,8% de las muestras se identificó VPH de alto riesgo tipos 16, 31 33, 35, 56,59 y 68; y 6,8% presentó VPH de riesgo intermedio al tipo 51, 53, 58, 61 y 83. El 18% fue representado por los de bajo riesgo 6,11, 32, 54 y 81. Concluyéndose que la técnica de PCR –RFLP estandarizada fue adecuada para el diagnóstico y tipificación del VPH. El 51,9% del total de las muestras resultaron positivas al virus, siendo el tipo 16 el más común 20% de los de alto riesgo y el tipo 6 más frecuente 23.8% de los de bajo riesgo (38).

Otra investigación cuyo objetivo fue determinar cuáles fueron los tipos de Virus Papiloma Humano encontrados en mujeres y hombres que asistieron a una

consulta privada de ginecología, en Valencia, Edo. Carabobo, donde se estudiaron 200 pacientes (175 mujeres y 25 hombres) con diagnóstico de VPH por clínica, colposcopia, citología, biopsia y PCR, obteniéndose los siguientes resultados: edad promedio de los pacientes osciló entre los 15 y 34 años de edad. 77% de las pacientes presentaron imagen colposcópica dominante acetoblanco, mientras que en el hombre correspondió a lesiones verrugosas. La citología cervical reportó VPH en solo 40% de los casos, mientras la biopsia demostró cerca del 80%. El PCR realizado en el 10% de los casos fue negativo en mujeres y 12% en hombres. Los subtipos 6 y 11 fueron los más frecuentes de bajo riesgo y los más comunes de alto riesgo fueron los tipo 16, 31 y 33. En los pacientes masculinos el 64% correspondió a los tipos de bajo riesgo 6 y el 11. Según la autora la diferencia entre hombres y mujeres, en cuanto a los tipos detectados hacen que aún no se comprenda en su totalidad la transmisión sexual (39).

En el estudio realizado durante el período 2004 a 2009, a través de un registro de 248 historias clínicas, de donde se tomaron 90 historias con diagnóstico positivo de infección por VPH (39,5%) predominó el grupo etario entre 21 y 30 años (25,5%), 50% eran solteras, 45,9% de ocupación de oficios del hogar. El motivo de consulta más frecuente fue la presencia de lesiones (71%), el prurito representó el 10%. El diagnóstico clínico más frecuente fue pápulas verrugosas (47,8%), lesiones en labios mayores representó el 40,7%. La biopsia fue confirmatoria en un 38% y el PCR 63% de los casos; representándose el tipo 6 y 11 como los más frecuentes de bajo riesgo, 57 y 23% respectivamente y el tipo 16 se detectó en el 5,3% de los casos. Además se

hizo mención al tratamiento utilizado el cual fue combinado en la mayoría de los casos 20,4%; criocirugía representó 17,3% y el ácido tricloroacético 16,3% (40).

Otra investigación cuyo objetivo fue identificar la mutación R50079X ubicada en el exón 18 del gen RB1, en pacientes que tenían lesiones cervicales asociadas a VPH, tomando una muestra de 72 mujeres, 36 sanas y 36 con infección por VPH, a quienes se les realizó PCR por hisopado y cepillado, donde se obtuvo como resultado identificación de la mutación R579X en el exón 18 del gen supresor de tumores RB1 en 30% de las muestras experimentales por lo que se concluyó que la mutación encontrada R579X en las muestras, conlleva a la formación de una proteína truncada no funcional y aunado a esto el VPH podría estar favoreciendo la inmortalización de dicha célula que presenta la mutación (41).

2.2. Enfoque epistémico

La postura epistémica del investigador y con él la posibilidad de autonomía investigativa, delimitan y marcan de alguna manera toda la investigación. En este sentido, el presente estudio toma elementos del paradigma positivista clásico entendiendo de esta forma la realidad circundante del investigador. Se fundamentó además aspectos teóricos ampliamente estudiados tales como: bases microbiológicas del virus, biología molecular, métodos para la detección del Virus Papiloma Humano, histología de piel y mucosa, citopatología e histopatología de los tejidos infectados

por VPH, historia natural de la infección viral, inmunología de la piel, terapéutica en infecciones causadas por VPH, epidemiología del virus y aspectos éticos y legales del estudio en seres humanos.

2.2.1. Paradigma Positivista

Este paradigma denominado también cuantitativo, empírico-analítico, racionalista, es el dominante en algunas comunidades científicas. Haremos referencia a él, ya que esta investigación se basó en el positivismo, donde la escuela filosófica defiende determinados supuestos sobre la concepción del mundo y del modo de conocerlo. Utiliza la vía hipotética deductiva como lógica metodológica válida para todas las ciencias.

El paradigma empírico-analítico explica, controla, predice en cuanto a su relación sujeto-objeto, tiene características independiente o neutral libre de valores. En cuanto a sus fundamentos, se refiere a un positivismo lógico, su dimensión es racionalista, cuantitativa. Sus criterios de calidad toman en cuenta la validez, objetividad y fiabilidad y sus técnicas e instrumentos son cuantitativos medibles como test, cuestionarios, observación sistemática, experimentación, en lo que respecta al análisis de datos, utilizan la estadística descriptiva e inferencial, el diseño estructurado y la muestra por procedimientos (42).

2.3.Fundamentos teóricos en relación al virus

2.3.1.VPH: Aspectos Microbiológicos y Biología Molecular

En la década de los 60, el Comité Internacional de Nomenclatura de los Virus dividió a los papovavirus en dos géneros: los papillomavirus y los polyomavirus, para formar a la familia *Papovaviridae*, más tarde se incluyó también a los virus SV40 (polyoma virus). La palabra *papova* se formó de las primeras letras de tres sílabas *pa* de papiloma *pode* polyoma y *va* de *vacuolatingagent*.

Los VPH son virus de DNA de doble cadena dispuesta en forma circular y enrollada; el tamaño de estos virus es de 52 a 55 nanómetros en su diámetro mayor, tienen peso molecular aproximado de 5.3×10 daltones. Se acepta que la forma de los VPH es icosaédrica, su cápside está conformada por 72 sub-unidades y carecen de envoltura de lípidos; la replicación de los VPH se realiza principalmente en el núcleo de las células con capacidad de proliferación y diferenciación, como son los epitelios de la piel y mucosas (2).

La infección, ocurre por contacto de epitelios estratificados pavimientosos con el virus, generalmente cuando existen microabrasiones producidas por traumatismos en la mucosa, durante las relaciones sexuales, por lesiones en el cuello uterino, vagina, en mucosa oral, anal o en piel, transfiriendo el virus al huésped

queratinocitoubicándose en el estrato basal. Se desconoce porque ciertos tipos de VPH eligen como blanco la piel y en otros casos la mucosa del tracto genital, la cual frecuentemente se relacionan con VPH de alto riesgo y con lesiones oro-ano-genitales por encontrarse displasias en ellos, que corresponden a cambios previos a la neoplasia(9).

En cuanto a los aspectos relacionados con la biología molecular, hasta la fecha se han aislado y caracterizado más de 100 tipos diferentes de VPH, basándose la identidad de cada nuevo subtipo en la descripción del ADN. Comparándolos con los genotipos ya conocidos, con los que debe compartir menos del 50% de genomas semejantes para caracterizarlos como un nuevo subtipo; por lo tanto la clasificación depende de la composición del ADN. De estos tipos, treinta de ellos se han asociado con lesiones del tracto anogenital. Los de bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 43,44) asociados frecuentemente con lesiones benignas tipo condilomas que raramente malignizan. Los de alto riesgo (16, 18,31,33,35,39,45,51,52, 53, 56,58) se relacionan con neoplasias intraepiteliales y cáncer invasivo, se dice que 85% de todos los cánceres del cuello uterino, contienen secuencias del ADN viral de alto riesgo (2).

Otro aspecto a resaltar, es que el virus está constituido por una cápside proteica que contiene su ADN, al entrar en contacto con la célula inserta, el material genético en ella, la invade y puede pasar a una de las dos fases conocidas como: fase lisogénica y fase lítica. Durante la primera, el virus permanece inactivo en la célula

huésped y no la afecta, la misma continúa funcionando de manera normal a pesar de la invasión viral. En la fase lítica, el virus se apodera de la célula huésped y la utiliza para su reproducción, por lo tanto el material genético del virus se apropia de las funciones celulares controlando el proceso reproductivo en ellas. El ADN viral ordena a la célula huésped que elabore proteínas y copias de DNA viral. Las proteínas de éste se integran en las cubiertas proteicas y así el DNA es empaquetado dentro de ellas, produciéndose mayor cantidad del virus en el interior del huésped. Al concluir este proceso reproductivo la célula muere y los virus recién producidos salen a infectar otras células (9).

La organización del genoma viral es similar en los diferentes tipos de VPH; consta de 8000 pares de bases distribuidas en tres regiones:

1. La región de control (URR, LCR) se forma por 400 pares de bases, los genes de esta región regulan la producción de proteínas y partículas virales (2).

2. La región temprana o *early* contiene genes virales que participan en la replicación viral, consta de varios segmentos en el genoma a los cuales se les ha llamado ORF (open readingframes); en esta región se distinguen seis segmentos (E1, E2, E4, E5, E6 y E7); la expresión de los genes en estos segmentos se ha relacionado con eventos de la replicación viral y en algunos serotipos con la transformación celular (2).

Los segmentos EI-E2 son necesarios para la replicación del DNA extracromosomal; cuando se presentan regulan la expresión de E6-E7 inhibiéndolos. E4 codifica proteínas tempranas que se encuentran en el citoplasma celular afectando a las citoqueratinas produciendo cambios coilocíticos característicos en el citoplasma. E5 está implicado con la transformación celular en los papilomas virus en relación con la interferencia de la proteína E5 con los receptores para factores de crecimiento epidermal alfa y beta, es decir, mejora el crecimiento epidérmico. Mientras que E6 y E7 están implicados en la transformación maligna de los queratinocitos en el cáncer cervical (2).

3. La región tardía o late se forma por ORF representado por dos segmentos L1 y L2; en ellos se encuentran genes que codifican proteínas estructurales que forman la cápside viral para la producción de nuevos virus (2).

Dos genes, P105Rb y p53, regulan la división celular normal, el primero produce los factores de transcripción necesarios para el avance a través del ciclo celular lo cual denota que P105Rb impide que la célula se divida hasta que haya aislado suficientes proteínas para su división celular (9).

La E2F es una proteína importante que produce P105Rb que lo convierte en un gen/proteína supresor de tumores. Cuando el VPH infecta una célula, el gen E7 se fija a Rb de tal modo que Rb libera a E2F y otras proteínas, lo cual constituye una

señal para que el ciclo celular avance, mientras E7 permanezca fijo a Rb este ciclo continuará causando una reproducción celular incontrolada lo que caracteriza a una célula maligna (9).

El p53 es otra proteína a quien el VPH ataca, quién actúa en respuesta al ADN dañado, cuando se lesiona el mismo, se detiene la división celular para corregir el daño, de no ser posible la reparación entonces ocurre la apoptosis (muerte celular programada) garantizándose así, que la célula lesionada muera y no se reproduzca. Se observa que en las células cancerosas a menudo el p53 aparece disfuncional, favoreciendo con ello a que las células con ADN alterado sigan reproduciéndose, en vez de ser destruidas. La proteína E6 puede fijarse al p53 e inactivarlo esto permite que el virus se apropie de la célula y se reproduzca; originando así un p53 inhibido por efecto viral, no permitiendo realizar su función (9).

El virus es estable en el medio ambiente, resiste la desecación, congelación, inactivación con éter, formalina, detergente, ácidos débiles y temperaturas a 55°C(2).

2.3.2.Métodos moleculares para la detección del Virus Papiloma Humano

La detección del VPH se ha ejecutado tradicionalmente a través de la observación de las características microscópicas de las células infectadas por el virus, sin embargo, esta técnica diagnóstica no permite detectar la fase latente de la

infección y menos aún identificar el tipo infectante, siendo difícil predecir el riesgo al que está expuesto el paciente. Las técnicas de biología molecular se están utilizando cada vez más para la identificación y tipificación del VPH. La reacción de la cadena polimerasa (PCR), es una de las técnicas más sensibles de la biología molecular, y consiste en la amplificación génica del ADN viral, para la tipificación del VPH (43).

Existen otros métodos basados en la biología molecular para detectar el VPH: *DotBlot*, *SouthernBlot*, hibridación *in situ*, captura de híbridos y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se describen a continuación los tres últimos ya que los dos primeros no se utilizan actualmente.

Hibridación in situ

Puede practicarse sobre extensiones citológicas o cortes tisulares. Las secuencias de ADN conocidas corresponden a secuencias comunes de los virus de alto riesgo. El procedimiento a grandes rasgos, es el siguiente:

- 1) Se procede a la separación de las cadenas de ADN objeto de estudio mediante el calentamiento de la muestra.
- 2) Se incuba con el ADN conocido, marcado de alguna forma.
- 3) Se enfría la muestra.

4) Si el ADN objeto de estudio reconoce al ADN conocido quedará fijado en la muestra, y los distintos métodos de revelado utilizados podrán identificarlo.

El resultado es similar al de la inmunohistoquímica y permite localizar la situación de las células positivas. Ofrece dos tipos de imágenes, una en mancha y otra <<granular>>. La primera de ellas estaría relacionada con la situación <<episomal>>del virus y la segunda, con la integración. Este tipo de positividad podría tener valor pronóstico. Este método es muy específico, pero poco sensible (9).

Captura de Híbridos

Este método utiliza muestras de células en suspensión. El concepto básico es similar al de la hibridación *in situ* pero utilizando ARN en vez de ADN. No es posible emplear tejido para la detección de VPH mediante este método.

Se trata de un método muy sensible, pero tiene un porcentaje de falsos positivos. El resultado que da el método es positividad o negatividad para virus de alto riesgo y, además, determina la carga viral, es decir, la cantidad de virus de una muestra determinada. Este método está aprobado por la FDA (9).

Híbrido de Captura II

La captura híbrida utiliza dos sondas, una para VPH de alto riesgo que incluye trece (13) tipos de VPH (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68), y otra para

el grupo de VPH de bajo riesgo que incluye cinco (5) tipos (6, 11, 42, 43, 44). Habitualmente en la práctica se utiliza la sonda para VPH de alto riesgo. Este método constituye la prueba de biología molecular más aceptada por la FDA (9).

Reacción en Cadena Polimerasa (PCR)

Utiliza cualquier tipo de muestra, células en suspensión o cortes histológicos. La base del método es similar a la explicada para la hibridación *in situ*. Se procede a la separación del ADN objeto de estudio y se amplifica un número determinado de veces de forma que es mucho más fácil detectar el ADN objeto de estudio porque existen muchas más copias (9).

En general, se utilizan los llamados <<primers o cebadores de consenso>> entre los cuales los más empleados son PGMY09/11, GP5+/GP6+ y SPF10 para la detección y presencia de VPH en una muestra determinada, lo que constituye su principal ventaja. Se practica una segunda PCR utilizando enzimas de restricción de haber dado positivo el resultado para la identificación del virus y de este modo poderlo tipificar. Empleando ambas PCR, se consiguen altas sensibilidades y especificidades. Esta técnica requiere de laboratorio y personal especializado, evitando la contaminación cruzada responsable de falsos diagnósticos (9). Dicho método está descrito en el Capítulo III.

2.3.3.Histología de piel y mucosas

La epidermis está constituida histológicamente por epitelio plano estratificado, donde se identifican cuatro estratos celulares bien definidos: basal, espinoso, granuloso y córneo.

Estrato Basal: llamado también estrato germinativo, por la presencia en él de células con gran actividad mitótica, células madres (StemCells) las cuales dan origen a los queratinocitos. Estrato representado por una sola hilera de células que contienen además, de las anteriores a los melanocitos, (célula dendrítica productora de melanina), células de langerhans que son presentadoras de antígenos y con prolongaciones citoplasmáticas, células de merkel que representan células epidérmicas modificadas que intervienen en la percepción cutánea y carecen de prolongaciones citoplasmáticas. Los queratinocitos se caracterizan por la particularidad de migrar a medida que maduran en los diferentes estratos de estos epitelios, para así producir queratina. Dicho estrato descansa y guarda relación con la membrana basal (10).

Estrato Espinoso: denominado también capa espinocítica, por su aspecto celular en forma de espinas, debido a las prolongaciones citoplasmáticas que presenta, ellas representan los queratinocitos que migran del estrato basal, observándose aquí con mayor tamaño y constituido por varias hileras de células.

Estrato Granuloso: Representa la capa más superficial de los epitelios no queratinizados, conformada también por dos a tres hileras celulares de queratinocitos en su espesor, caracterizándose las mismas por la presencia de gránulos de queratohialina, que tiñen intensamente basófilo dicho estrato, permitiendo así, identificarlo con cierta facilidad en los cortes histológicos.

Estrato Córneo: es la capa más superficial de los epitelios queratinizados como la piel y mucosa masticatoria. Constituida por células escamosas o planas anucleadas que pierden sus organelas citoplasmáticas llenándose de filamentos de queratina. Representan los queratinocitos maduros por diferenciación celular y una forma especializada de apoptosis (muerte celular) por la descamación de células. Se habla de un estrato lúcido restringido a la piel gruesa ubicado como una variable de este mismo estrato(10).

Los *Queratinocitos:* constituye la población celular intrínseca permanente del epitelio estratificado escamoso. Constituyen las células más abundantes, varían su morfología de acuerdo al estrato que ocupen, observándose de forma cúbica en el estrato basal, forma poligonal con discretas prolongaciones a manera de espinas en el espinoso, y aplanadas en el estrato granuloso. Desde el punto de vista ultraestructural presentan organelas citoplasmáticas: Ribosomas libres, Retículo endoplasmático rugoso (RER), por su actividad metabólica en la síntesis de proteínas, mitocondrias, aparato de Golgi, tonofilamentos más abundantes en el estrato espinoso

y granuloso; gránulos de queratohialina y cuerpos de Odland o cuerpos laminares que vierten su secreción por exocitocis al espacio intercelular entre el estrato granuloso y córneo; conformando ese material una barrera impermeable al agua en los epitelios queratinizados(10).

Se ha observado por técnicas de inmunocitoquímica receptores de adhesión de la superficie celular, denominadas integrinas, observándose principalmente en las células basales del epitelio, constituidas por Glicoproteínas transmembranosas que se encargan de enlazar por una parte al citoesqueleto celular y por otra, la matriz extracelular. Ellas desempeñan un papel importante en la migración y en consecuencia en la organización espacial de ellas en el epitelio.

Los mismos autores describen una población celular extrínseca permanente constituida por los melanocitos que derivan del ectodermo de la cresta neural, productores de melanina. Células de langerhans de origen mensenquimático que son células presentadores de antígenos a los linfocitos T, con prolongaciones dendríticas al igual que los melanocitos; siendo visibles en el estrato espinoso por técnicas de inmunohistoquímica con marcadores antigénicos incorporados desde la membrana al interior de la célula, para su procesamiento. Son células ampliamente distribuidas en los diferentes estratos por lo que se consideran una población celular circulante. Por último las células de Merkel localizadas en el estrato basal, carecen de prolongaciones citoplasmáticas son de aspecto claro con gránulos densos en su

interior y funcionalmente representan células sensoriales adaptadas a la percepción de la presión(44).

2.3.4.Citopatología e Histopatología de los tejidos infectados por VPH

En el diagnóstico histocitopatológico de infección por VPH, se utilizan dos métodos diagnósticos de rutina: citología exfoliativacervico-vaginal y la biopsia dirigida. Entre los hallazgos histopatológicos característicos compatibles con este tipo de infección se citan: hiperplasia epitelial, papilomatosis con hiperqueratosis, paraqueratosis (hipertrofia del estrato córneo), además se acompañan de cambios específicos celulares denominados coilocitosis, termino referido a los trastornos observados por incremento del volumen en el queratinocito con imagen de cavitación intracitoplasmática, siendo visible vacuolización del citoplasma alrededor del núcleo, observándose como un espacio blanco intracitoplásmatico(45).

Las células muestran alteración de la relación núcleo citoplasma, hipercromasia, aspecto borroso de la cromatina, displasia leve o moderada (9). Se puede observar además, acantosis expresada por el aumento del espesor del epitelio estratificado escamoso, debido a la proliferación celular del estrato espinoso. El núcleo se observa con modificaciones tales como pleomorfismo, plegamientos de la membrana nuclear, hipercromatismo nuclear, opacidad en la cromatina, binucleación y atipias nucleares (45).

En las citologías cervico-vaginal se pueden observar cambios en las células normales, pudiéndose asociar dichos cambios con infección por VPH y con lesiones escamosas intraepiteliales (LEI) o neoplásicas intracervicales (NIC). Las LEI pueden ser de bajo grado (LEI BG) y usualmente no progresan hacia la invasión intraepitelial y pueden regresar espontáneamente, pertenecientes a esta clasificación el VPH y NICI. Los LEI de alto grado (LEI AG), usualmente evolucionan en alto porcentaje a carcinoma invasor, si no es tratado, perteneciendo a esta clasificación los NIC II y NIC III (46).

En los frotis cervico-vaginales se presentan alteraciones citológicas propias del VPH conocidas como atipias coilocíticas producidas por los cambios virales, descritos como coilocitosis y posteriormente como coilocitosis atípica. La apariencia de “citoplasma vacío” (del griego koylos) es el resultado de la disrupción de la matriz queratínica del citoplasma producida por la proteína viral E4. Se conoce también como efecto citopático del virus y se expresa como una vacuolización peri nuclear en contraste con el citoplasma periférico, más denso y coloreado irregularmente. Los núcleos exhiben incremento de su tamaño, ondulación de sus membranas y la cromatina se dispone de una manera peculiar similar a la de una cuerda. Puede verse más de un núcleo (binucleación). Es importante que las alteraciones nucleares acompañen los cambios citoplasmáticos para poder atribuirlo a la infección por VPH, ya que puede haber otras causas que cursen con citoplasma claro como resultado de la acumulación de glucógeno (47).

En la práctica se consideran como alteraciones propias de la infección por VPH observadas en células epiteliales del exocervix los siguientes signos: coilocitosis, alteraciones nucleares (binucleación y membrana nuclear plegada), disqueratosis (queratinización citoplasmática a niveles no superficiales) y exocitosis (presencia de polimorfonucleares neutrófilos entre las células del epitelio estratificado). Puede verse mitosis, pero nunca son atípicas en el estrato basal. Estos cambios pueden cursar con cierto grado de inflamación y proliferación capilar en el estroma cervical (subepitelial) (47).

Refieren además que la metaplasia escamosa inmadura atípica, se caracteriza por agrupamiento desordenado de los núcleos, pérdida de la polaridad y atipia celular con incremento de la relación N/C, alteraciones en buena parte vinculadas al VPH del 40 al 70% de los casos y deben distinguirse de la displasia y de la atipia reactiva. La metaplasia papilar inmadura, constituye una entidad rara que puede afectar extensamente al endocervix. La mayoría de los casos están vinculados a una infección por VPH tipo 6/11. El rasgo histopatológico principal consiste en una proliferación celular escamosa con elevación de la relación N/C(47).

2.3.5.Historia natural de la infección viral

Los virus se consideran parásitos intracelulares estrictos, cuyo elemento viral más importante es el genoma, que puede estar constituido por DNA ó RNA

dependiendo del tipo de virus. Básicamente tienen un ciclo de vida representada por dos fases; una extracelular donde se conoce como virión donde la información genética se cubre de una capa proteica. La función de éste es la de transmitir la información genética a una célula susceptible. En la fase intracelular el virus no presenta la cápside proteica, esta fase puede durar días o años, cuando ella se prolonga por años se conoce como latencia viral(48).

Es importante denotar que la cápside de algunos virus está envuelta por una cubierta protectora que no resiste la desecación, lo cual constituye un aspecto importante en la infectividad del virus, ejemplo de ello lo representa los retrovirus y el herpes. Los viriones que no presentan estas envolturas protectoras se conocen como desnudos y tienen la particularidad de permanecer infectantes por períodos prolongados después de la desecación tal es el caso del VPH.

Se estima que del 30 al 50% de la población sexualmente activa, presenta infección por VPH de forma asintomática y el 25% puede presentar manifestaciones clínicas (48).

La infección viral se presenta en tres etapas:

1. **Etapas Clínicas:** es aquella en la cual la infección se manifiesta con expresión activa del virus, es decir, que cursa con signos y síntomas y es diagnosticable a simple vista, tal es el caso del condiloma acuminado o verrugas

genitales, las cuales se observan como neoformaciones exofíticas, generalmente múltiples y confluentes con proyecciones filiformes o papilomatosas de textura suave, que pueden medir de 0.2 a 1 cms, pueden proliferar rápidamente adquiriendo el aspecto de coliflor (7, 42). Se localizan habitualmente en el área genital a nivel de vulva, vagina, cervix, periné, ano y pene. En el cuello uterino se presentan en forma de lesiones planas generalmente por el tipo 16 y 18 (49). La infección clínica se asocia con prurito vulvar, leucorreas tipo bacterianas, candidiasis, tricomoniasis, clamidias entre otras (48). Las lesiones en esta etapa clínica son causadas generalmente, por VPH de bajo riesgo oncogénico 6 y 11(50).

2. **La infección en Etapa Subclínica:** es aquella en la cual la enfermedad se presenta con expresión mínima, asintomática y se puede diagnosticar en la mujer por colposcopia o peneoscopia en el hombre y por la presencia de lesiones blancas, planas, aceto positivas (epitelio blanco) (7, 48).

3. **Infección en Etapa Latente:** no está asociada a cambios morfológicos visibles en el epitelio escamoso y solo puede ser detectada por técnicas de biología molecular como hibridización in situ y PCR (7). En esta etapa la carga viral es tan baja que los pacientes no contagian la enfermedad y no presentan riesgo de desarrollar cáncer(51). Asimismo, otros autores señalan a esta etapa de la infección, como la invasión del mismo en el huésped, donde el virus no se

replica y permanece en el núcleo en forma circular como episoma, a esta fase se le conoce como etapa latente, en ella no se observan efectos citopáticos característicos y el virus solo puede identificarse empleando métodos moleculares(33).

Otros definen latencia viral como aquella infección persistente donde hay síntesis limitada de macromoléculas víricas, pero no hay síntesis viral (52).El papel patogénico de la infección latente continua generando discusión, ya que la carga viral en el núcleo del queratinocito basal es tan poca y por ende no replicativa, por lo que carece de significación biológica. Para que pueda existir replicación o expresión génica tardía que codifique proteínas de la cápside, es necesaria la diferenciación del queratinocito del estrato espinoso. Se dice que el receptor para el VPH puede ser la integrina α -6- β -4, que representa una molécula de adhesión presente en la superficie de los queratinocitos basales y que ayuda a la migración celular, una vez diferenciada la célula, facilitando la infección a través de viriones(48).

La infección en fase de latencia es una etapa teórica de la enfermedad, observado a través de estudios donde se vigiló esta etapa por más de 10 años, observando que los pacientes no transmitieron la enfermedad, ni presentaron lesiones colposcópicas visibles, ni por Papanicolaou (53).En los principios de virología las infecciones latentes pueden caracterizarse por cuatro propiedades generales: la célula infectada no se replica o el genoma viral se replica en conjunción o en conjunto con

la réplica del ADN de la célula huésped, puesto que el ciclo celular no se interrumpe; la inmuno-detección de células memorias del genoma latente se reduce o elimina en la expresión de los genes virales en el ciclo reproductivo donde está ausente o es ineficiente. En el genoma viral persiste intacto en sí mismo, por algún tiempo prolongado, la infección aguda productiva puede iniciarse para asegurar la proliferación de su progenie a un nuevo huésped(54).

Si la etapa de latencia tiene algún valor como estrategia de supervivencia, el virus latente debe tener algún mecanismo para reactivarse, de modo que pueda separarse e invadir o migrar hacia otros huéspedes. La reactivación sigue generalmente a un trauma, stress, lesión u otras injurias, condiciones que pueden marcar al huésped, en lo relacionado a la latencia viral(54).

La infección latente no produce cambios detectables ni clínica ni microscópicamente, los tejidos son de apariencia normal, las técnicas de biología moleculares detectan secuencias de ADN del VPH en muestras del tejido. Vale la pena destacar la historia natural de esta infección y el papel importante que juega el sistema inmunológico del paciente en cuanto a la progresión o no de la infección, donde en la mayoría de los casos existe una resolución espontanea de las lesiones clínicas producidas por VPH por destrucción de las células infectadas por el virus, mientras un 30% d los casos presentan infección persistente y los cambios celulares se hacen progresivos por una franca evasión que hace el sistema inmune celular (2).

2.3.6. Inmunología de Piel y Mucosas

Hoy se sabe que la piel y mucosas poseen mecanismos propios de respuestas que constituyen un sistema inmunitario dinámico y eficaz en la defensa del hospedador; conformado por elementos celulares y humorales (55).

La inmunidad durante la infección por VPH esta mediada principalmente por células, como mecanismo para enfrentar o rechazar al VPH. En condiciones patológicas las verrugas exhiben un comportamiento más florido y a veces agresivo ante el deterioro de este tipo de inmunidad. Entre los cambios histológicos observados se mencionan: infiltrado linfocitario y fagocitario; incluyendo linfocitos T cooperadores y supresores, además de células de langerhans, como reflejo de la actividad de la respuesta inmune en contra del VPH. La inmunidad humoral parece tener cierta participación, pero de menor trascendencia, en algunos pacientes con enfermedad activa o con historia de recurrencia viral, presentan anticuerpos contra la cápside viral (48).

El sistema inmunitario cutáneo (SIC) está constituido básicamente por las células de langerhans (CL), los queratinocitos en la epidermis, las células dendríticas dérmicas, los fibroblastos, vasos linfáticos regionales y la unidad dérmica perivascular (UDP) en la dermis. En el SIC existe un predominio de respuestas celulares mediada por los linfocitos, T, cuya función es la de establecer la interacción

entre el ambiente epidérmico y los ganglios linfáticos regionales a fin de inducir respuestas de resistencia o tolerancia. Las células presentadoras de antígenos entre los cuales se encuentran las células de Langerhans con sus gránulos de Birbeck, vistos ultra estructuralmente en microscopia electrónica, representantes de la epidermis, la cual tiene como función en su etapa de actividad captar y procesar antígenos hacia los ganglios linfáticos regionales (55).

Las células dendríticas dérmicas son también presentadoras de antígenos vistas en mayor proporción en la dermis. Los queratinocitos que son células epidérmicas producen citocinas cuando son activados de manera inespecífica y son capaces de fagocitar y presentar antígenos. La unidad dérmica perivascular configurada por células endoteliales, células dendríticas dérmicas, macrófagos, mastocitos y linfocitos T. Estos elementos interactúan al producirse un daño en la piel para producir la respuesta inmunitaria caracterizada por un infiltrado inflamatorio (55).

Para la respuesta inmunitaria cutánea, ante la presencia de un estímulo específico, se activan tanto las células de langerhans como los queratinocitos, ambos pueden liberar citocinas y quimiosinas que generan señales de reclutamiento y activando linfocitos T hacia el sitio de la lesión o injuria, produciendo el infiltrado inflamatorio (55).

En la mayoría de los casos, el sistema inmunitario del paciente limita los cambios progresivos, destruyendo las células infectadas por el VPH, lo cual se conoce como regresión espontánea de las lesiones. Se piensa que la respuesta inmune celular puede eliminar a las células afectadas por el virus (2).

2.3.7. Terapéutica en infecciones causadas por VPH

El manejo de las lesiones causadas por VPH, ha sido inespecífico desde un principio, por no contar con un antiviral específico o una vacuna para todos los casos de infecciones por VPH. Sin embargo, actualmente con los conocimientos que hay sobre el virus y la respuesta inmune del paciente, los tratamientos actuales han logrado ciertos objetivos entre ellos:

- Ser específicos y atacar al agente causal.
- Factibilidad en su aplicación en cualquier tipo de infección por VPH.
- Que estimule la respuesta inmune en el paciente (2).

Mientras no se cuente con una terapéutica ideal, se justifica continuar con los tratamientos quirúrgicos y tópicos, los cuales se deben combinar para mejorar los resultados, ya que la experiencia ha demostrado que usando los métodos aisladamente en este tipo de lesiones se ha observado que los pacientes presentan cerca del 50% de

recurrencia. Cada método terapéutico debe adaptarse a cada situación. Se describirán a continuación algunos métodos terapéuticos:

1) *Tratamientos tópicos:* los tópicos que tienen efecto terapéutico contra el VPH han soportado el paso del tiempo, el ácido tricloroacético al 50- 80%, el 5 fluorouracilo, la podofilina y sus derivados, ácido acético concentrado (50-100%). Los mismos presentan desventajas como toxicidad, reacciones adversas, quemaduras químicas, intolerancia del paciente, esquemas de aplicación y tiempo de exposición a dosis prolongadas. Su efecto en infecciones latentes se desconoce. Otro método tópico a mencionar considerado ideal para las lesiones por el virus es el ácido acético concentrado al 100%, el cual inactiva al virus en la superficie de los epitelios; dicha inactivación se realiza principalmente por su PH ácido que causa un efecto citotóxico en las células, ya que disminuye el PH intracelular. Este ácido tiene gran poder de penetración en los tejidos, lo que constituye una ventaja para su uso, así mismo no es tóxico a dosis recomendadas y es activamente metabolizado por enzimas que se encuentran en los tejidos. Se recomienda su utilización asociados a métodos quirúrgicos. Como desventaja podrían observarse quemaduras químicas, sin embargo las mismas se neutralizan rápidamente con lavado de la zona con agua. Por lo que se considera el uso del ácido acético concentrado como el tópico ideal (2).

Existen algunas vacunas tanto profilácticas como terapéuticas, aún en fase experimental contra el Virus Papiloma Humano, disponibles actualmente.

- *Vacuna Profiláctica Bivalente (Cervarix, GlaxoSmithKline)*: la vacuna está compuesta por partículas similares al virus (Virus Likeparticles o VLP tipo L1) de la cápside de los tipos 16 y 18. La inmunogenicidad, la seguridad y eficacia de la vacuna en la prevención de la infección transitoria y persistente por los dos tipos incluidos en la vacuna y en la prevención de lesiones cervicales fue evaluada por diversos ensayos clínicos. La pauta de vacunación es de tres dosis de 0.5 ML por vía intramuscular en esquema de I dosis, II dosis al mes de la I dosis y la III a los 6 meses de haber realizado la segunda.
- *Vacuna Profiláctica Tetravalente (Gardasil, Sanofi Pasteur MSD)*: esta vacuna incorpora los tipos 6 y 11 asociados a condilomas o verrugas genitales considerados de bajo riesgo y además a los tipos 16 y 18, compuesta por VLP (Virus-Likeparticles) de la proteína L1 de la capsula de los cuatro tipos de VPH y su inmunogenicidad y eficacia también fue verificada por diferentes ensayos clínicos. La pauta de vacunación es de tres dosis de 0.5ML por vía intramuscular con un esquema: I dosis, II dosis con intervalo de un mes de la primera dosis y la III dosis a los 6 meses de la segunda (9).

El desarrollo de las vacunas profilácticas para prevenir las infecciones por VPH representó un gran avance al descubrirse particulares similares al virus VLP, tipo L1 purificadas, una proteína estructural del VPH, que se utiliza como antígeno, que son inmunogénos y producen síntesis de anticuerpos neutralizantes. No contienen material genético, por lo que no pueden causar infección en el huésped(56).

2.3.8.Epidemiología del Virus

Uno de los descubrimientos más importantes en la investigación etiológica del cáncer estos últimos veinticinco años, ha sido la demostración de que el cáncer de cuello uterino es causado por el Virus Papiloma Humano (VPH), la evidencia científica acumulada a partir de los estudios virológicos, moleculares, clínicos y epidemiológicos ha permitido demostrar y describir de forma inequívoca que el cáncer de cuello úterino es en realidad una secuela a largo plazo, de una infección persistente por ciertos genotipos de VPH, el cual es de transmisión primordialmente sexual (9).

Hay autores que aseveran que el VPH es resistente a la inactivación y por ende se puede transmitir a través de fómite, como superficies encimeras o muebles, pisos de baño, ropa íntima, toallas, entre otros. La difusión asintomática puede facilitar la transmisión. La infección se puede adquirir: **a)** Por contacto directo a

través de pequeñas laceraciones en piel y mucosa genital durante relaciones sexuales, y mediante el paso del feto por el canal del parto o vagina infectada (52).

Estudios epidemiológicos indican que la infección genital causada por VPH es actualmente la infección de transmisión sexual más común. El incremento de la prevalencia de esta infección se debe en gran parte a la conducta sexual y a la falta del diagnóstico oportuno y tratamiento específico (2).

Existen datos epidemiológicos contradictorios acerca de la historia natural de estas infecciones, algunos aseguran que la infección es transitoria y que solo 15% de los casos continúa con la infección asociada a los cambios premalignos o malignos del epitelio. Mientras que otros indican que la infección entra en un largo período de latencia, 30% de los afectados pueden presentar cambios a nivel de los epitelios con carácter progresivo de lesiones benignas hacia lesiones premalignas como la neoplasia intraepitelial de los genitales en los primeros 10 años y posteriormente progresar al cáncer genital, principalmente a nivel del cuello uterino (2).

Los tipos de VPH 16 y 18 se han asociados con mayor frecuencia a lesiones localizadas en el cuello uterino, por su persistencia generan alteraciones citológicas características y de curso silente. También se ha observado que en pacientes inmunodeprimidos es mayor la prevalencia de las neoplasias intraepiteliales y el cáncer cervicouterino producidos por estos genotipos virales (2).

Las verrugas genitales o condilomas son causados por los tipos de bajo riesgo: 6 y 11; mientras que en estudios de pacientes con cáncer cervical se detectó que el VPH estuvo involucrado en el 95% de los casos, el tipo 16 correspondió al 50%; el 18 al 12% y el tipo 31 al 5%(2).

En Venezuela para el 2007, se notificó en el Anuario de Mortalidad, 1552 defunciones por esta patología y las estimaciones del Registro Central de Cáncer, cuantifican en 3720 los diagnósticos de cáncer invasivo de cuello uterino para el 2008. Es evidente que las cifras absolutas de mortalidad muestran un aumento continuo al pasar de 810 defunciones en 1980 a 1552 en el 2007; observándose que se ha duplicado el número de defunciones en ese período. En Venezuela este cáncer de cuello uterino constituye la primera causa de muerte por cáncer en la mujer y ocupa el cuarto lugar dentro de las causas de mortalidad por enfermedades específicas (56).

Entre los principales factores de riesgo que se ha observado en nuestro país para contraer el cáncer de cuello uterino, originado por este virus, está el inicio precoz de relaciones sexuales, teniendo en cuenta que el 30% de nuestras adolescentes inician su actividad sexual entre los 12 y 14 años. Otro factor es el comportamiento sexual en cuanto al hecho de tener más de 2 parejas sexualmente activas con una relación mínima de tres meses (56).

Este virus de VPH representa en nuestro país, un problema de salud pública con una incidencia de 25,54% seguido por el cáncer de mama 16,42% y el Cáncer de colon y recto 7,03%; detectándose cada año 3000 casos nuevos en mujeres con edades comprendidas entre 25 y 64 años, constituyéndose esta afección la primera causa de muerte oncológica en la mujer venezolana (57).

En Estados Unidos existe aproximadamente 20 millones de individuos infectados por este virus y cada año se registran 5.5 millones de nuevos casos. El mismo aparece en el 99.7% de las neoplasias cervicales siendo los tipos: 16, 18, 31, 45 los implicados en el carcinoma cervical, siendo esta la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres (52).

2.4.Aspectos Éticos y Legales de la Investigación sobre el VPH en seres humanos.

La Bioética ha orientado el sentido de imponer límites en el campo de la investigación científica aplicada a la vida, con el fin de salvaguardar la persona humana; realidad reflejada en el debate actual sobre el consentimiento informado y la necesidad de investigar en la práctica médica con el objetivo de prevenir y controlar abusos con la investigación bio-médica, elaborándose diferentes documentos tales como: Código de Nuremberg (1946), Código y Declaración de Helsinki (1964), Código de Tokio (1975), el Informe Belmonte (1979) entre otros (58).

La investigación clínica se realiza tanto con seres humanos sanos como enfermos por lo tanto, la nueva ética del ensayo clínico se estructura bajo tres criterios: autonomía (consentimiento informado del paciente), beneficencia (relación riesgo/beneficio) y justicia (selección equitativa de los sujetos sometidos al ensayo).

Desde la perspectiva ética, la experimentación científica en seres humanos está obligada a cumplir los siguientes requisitos:

- a) Idoneidad científica de los investigadores; en consecuencia, conocimiento del método científico.
- b) Certeza de la inocuidad de las sustancias o técnicas probadas.
- c) Conocimiento riguroso del estado de salud o enfermedad de quienes se presten voluntariamente a la experiencia.
- d) Consentimiento informado por parte de cada voluntario, que debe saber claramente lo que se desea obtener con el fármaco o la técnica, y los actuales y remotos peligros que podría acarrear.
- e) Libertad de la persona para retirarse de la experimentación en cualquier momento si así lo desea.
- f) Suspensión inmediata de la experimentación si aparecen daños en la salud atribuibles al fármaco ó a la técnica nueva empleada.

g) Certeza de la salud mental de los candidatos.

h) Aprobación del proyecto por una comisión de ética de la universidad o de alguna institución científica de reconocido prestigio(59).

Todos estos requisitos fueron cumplidos durante la realización del proyecto de investigación sobre la infección por virus papiloma humano, así como en el desarrollo de la misma.

En lo concerniente al consentimiento informado constituye un prerequisite para participar en una investigación. Este deriva del principio de respeto a las personas, enunciado en el Código de Nuremberg. Para que haya consentimiento deben estar presentes cuatro elementos: información, capacidad para consentir y voluntariedad (59). El consentimiento informado significa que el individuo evaluado o encuestado está de acuerdo y en conocimiento sobre la información, así como con quien se va a compartir y para qué fines, lo que permite comunicar la información suministrada (60). El consentimiento informado realizado a las pacientes de la muestra consideró todos estos aspectos.

En cuanto a las normativas legales en el campo de la investigación, los sistemas jurídicos en los países latinoamericanos cuentan en su mayoría, con un nivel

constitucional donde se reconoce la dignidad humana y el derecho a la salud, lo cual resulta importante por ser la constitución la norma suprema del sistema jurídico.

Venezuela cuenta con comités de ética, por lo cual en la situación actual los sistemas jurídicos contemplan ciertos artículos de la Constitución Bolivariana de la República de Venezuela, que a continuación se mencionan:

Artículo 46. Toda persona tiene derecho a que se respete su integridad física, psíquica y moral en consecuencia:...Ninguna persona será sometida sin su libre consentimiento a experimentos científicos, a exámenes médicos o de laboratorio, excepto cuando se encontrare en peligro su vida o por otras circunstancias que determine la ley.

Artículo 83. “La salud es un derecho social fundamental, obligación del Estado, que lo garantizará como parte del derecho a la vida. El Estado promoverá y desarrollará políticas orientadas a elevar la calidad de vida, el bienestar colectivo y el acceso a los servicios”.

Artículo 110. “El Estado reconocerá el interés público de la ciencia y garantizará el cumplimiento de los principios éticos y legales que deben regir las actividades de investigación científica humanística y tecnológica. El Código de Bioética y Bioseguridad intenta contribuir al desarrollo del potencial ético de la persona en sus desempeños, como investigador y como miembro de una comunidad haciendo énfasis en la construcción de la conciencia bioética” (58).

El Código de Ética en Medicina aprobado en el año 2003, indica en el artículo 207 la importancia del consentimiento informado por escrito y, el artículo

216 hace referencia a la revisión de los protocolos de investigación en seres humanos y la autorización para su ejecución la cual debe ser realizada por los Comités de Ética de Investigación Clínica, los cuales ejecutan las normas diseñadas por la institución de Bioética del Gobierno Nacional. Los estudios biomédicos y epidemiológicos requieren ser realizados bajo un comportamiento ético y siempre bajo la guía de los principios rectores de Autonomía, Beneficencia, Justicia y No Maleficencia (58).

El proyecto y la investigación que se realizó contaron con el apoyo del Comité de Ética de la Universidad de Carabobo siguiendo las instrucciones internacionales ya indicadas. Las pacientes fueron debidamente informadas, a través de las entrevistas realizadas en la consulta médica sobre el propósito que pretendía la presente investigación, cuyo fin único fue el de mejorar su calidad de vida y mantenerlas alejadas preventivamente de la posibilidad de contraer un cáncer cervical, por la relación existente entre el virus y esta patología.

Respetando los principios del Código de Nuremberg (1946) principalmente el de la Beneficencia y la No Maleficencia suscrito también en el Código de Ética en Medicina, en su artículo 216, donde se expone en parte de su contenido “Los estudios biomédicos y epidemiológicos requieren ser realizados bajo un comportamiento ético y siempre bajo la guía de los principios rectores de Autonomía, Beneficencia, Justicia

y No Maleficencia” (58); razón por la cual la investigación respetó y se acopló a estos principios durante el procedimiento y método aplicado al estudio.

Para diagnosticar se utilizaron los métodos clínicos indicados para esta infección, así como para los controles, aplicación de métodos inocuos no invasivos como el PCR por cepillado con citobrush en el área genital y no se utilizó la biopsia para control, ya que la misma está indicada para el diagnóstico de lesiones en tejidos y no para el control de tejidos sin lesiones o sanos, acatando de este modo el principio rector de la No Maleficencia.

CAPITULO III

MOMENTO METODOLÓGICO

3.1. Nivel y tipo de investigación

La investigación se abordó bajo el enfoque epistémico positivista, con un marco metodológico empírico analítico. El nivel de la investigación se ubicó dentro de los estudios comparativos correlacional, de campo y de corte longitudinal.

3.2. Población y muestra

Se utilizó una población de 270 pacientes con sospecha clínica de VPH que acudieron a una consulta ginecológica privada, de quienes se extrajo una muestra no probabilística intencional, siendo ésta aquella donde se escoge sus unidades no en forma fortuita, sino completamente arbitraria, asignando a cada unidad características que para el investigador resultan de relevancia, empleadas frecuentemente en estudios de casos y en medicina (61). Dicha muestra estuvo constituida por 110 pacientes, la cual fue representativa de la población (40,7%) por ser mayor al 30% (62).

La muestra estuvo formada por pacientes con edades comprendidas entre 16 y 55 años que acudieron a la consulta de ginecología durante el periodo 2006-2011. Tomando los siguientes criterios de inclusión: pacientes voluntarias para realizar el estudio, diagnóstico presuntivo de VPH por clínica, colposcopia, citología, biopsia y reacción en cadena polimerasa (PCR) por biopsia fresca, tener conocimiento y estar de acuerdo con el propósito de la investigación a través del consentimiento informado y mantenerse en la consulta durante todo el período de tratamiento, evaluación y seguimiento para poder ser controladas posteriormente cada seis meses una vez terminado el tratamiento.

Vale la pena destacar, que en estos estudios casi siempre se emplean muestras pequeñas no aleatorias donde los criterios para seleccionar a los participantes son dados por el investigador. El diseño de muestreo aquí utilizado es el muestreo por conveniencia, realizado con los pacientes voluntarios de la consulta privada de donde se obtuvo toda la información; los criterios de inclusión utilizados fueron para asegurar que la muestra fuera adecuadamente escogida (63,64).

3.3. Técnicas y métodos de recolección de datos.

La recolección de la información se realizó a través de una ficha de registro en donde se vertieron datos obtenidos en concordancia con el propósito de la investigación, de historias clínicas, la cual contenía la descripción clínica de las

lesiones, informe colposcópico, informe citológico, resultados de la prueba de biología molecular reacción en cadena polimerasa (PCR) por biopsia, y reporte histopatológico por biopsia fresca, dichos parámetros se utilizaron para el diagnóstico inicial de VPH en todas las pacientes del estudio.

3.3.1 Descripción del Procedimiento

Momento inicial: diagnostico

A las 110 pacientes con diagnóstico clínico de VPH, caracterizado este por la presencia lesiones de tipo verrugosas exofíticas, pediculadas o sésiles, lesiones planas e hiperqueratosis en el área genital. Diagnóstico colposcópico basado en lesiones acetopositivas planas o ásperas, mapeado geográficos, epitelio blanco, punteado fino o grueso hasta condilomas exofíticos(65) y diagnóstico por citología exfoliativa, la cual se realizó a nivel vulvovaginal y de cuello uterino con reporte o no de signos sugestivos de VPH, es decir, lesión intraepitelial de bajo grado (LIE BG) o lesión intraepitelial de alto grado (LIE AG). Diagnóstico por biopsia del área genital dirigidas por colposcopia, la cual consiste en la remoción de un fragmento de piel o mucosa del paciente para su estudio histopatológico, tomando en consideración el protocolo para la toma de biopsias, la cual es realizada previa sepsia y antisepsia de la zona, infiltración de anestesia local (lidocaína al 1%) utilizando una pinza en sacabocado de cuello uterino, en este caso tipo Shuber, para realizar las escisiones de

las lesiones previamente distendidas y elevadas con aumento del turgor que facilita el procedimiento de corte de las lesiones previamente infiltrada, pudiéndose extraer varias muestras (entre 4 y 5 muestras) las cuales deben ser fijadas en formolaldehído al 10% para preservar las características morfológicas e histológicas del tejido (66,67). Finalmente se realiza el diagnóstico de tipificación del VPH por PCR.

Para el procesamiento citológico y de biopsia de tejidos con lesiones, las muestras fueron enviadas al Laboratorio Anatomopatológico NAVAPAT, C.A., ubicado en Naguanagua, Edo. Carabobo.

La detección de VPH se ha determinado tradicionalmente a través de la observación de las características microscópicas de las células infectadas por el virus, sin embargo, esta técnica diagnóstica no permite detectar la fase latente de la infección y menos aún identificar el tipo infectante, siendo difícil predecir el riesgo al que está expuesto el paciente. Las técnicas de biología molecular se están utilizando cada vez más para la identificación y tipificación del virus (43).

Haciendo referencia a la biología molecular expuesta en el Capítulo II (Marco Teórico Referencial), a continuación se describe la metodología de estudio desarrollada en ella.

La muestra biológica empleada fue de ADN del virus papiloma humano (VPH) obtenido de lesiones en tejido de genitales femeninos procedente de la vulva, de la uretra, de la vagina y del cuello uterino. La obtención de la muestra fue mediante la técnica convencional para biopsia fresca. La biopsia fue tomada de tejido con lesiones colposcopicamente identificadas previa colocación de ácido acético al 3% con pinzas de biopsia tipo *Shuber* en condiciones de asepsia.

El tejido fresco obtenido para PCR de las biopsias se sometió a un tratamiento de ribonucleasa, proteinasa K, fenol-cloroformo y etanol para la extracción y purificación del ADN viral. Una vez que se obtuvo el ADN se procedió a realizar el diagnóstico del VPH mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar un fragmento de 450 pares base (pb) de la región expresa para L1 de la cápside del virus. Los ensayos se realizaron siguiendo el protocolo Promega para GoTaq® flexi DNA polymerase en condiciones estandarizadas, que contenían tampón de reacción colorlessGoTag™, MgCl₂ 1,5mM, Nucleotidos/mix dNTP's 0,2mM, Taq polimerasa (5u/μl), ADN y *primer* o cebadores MY9 y MY11 para un volumen de reacción final de 50μl.

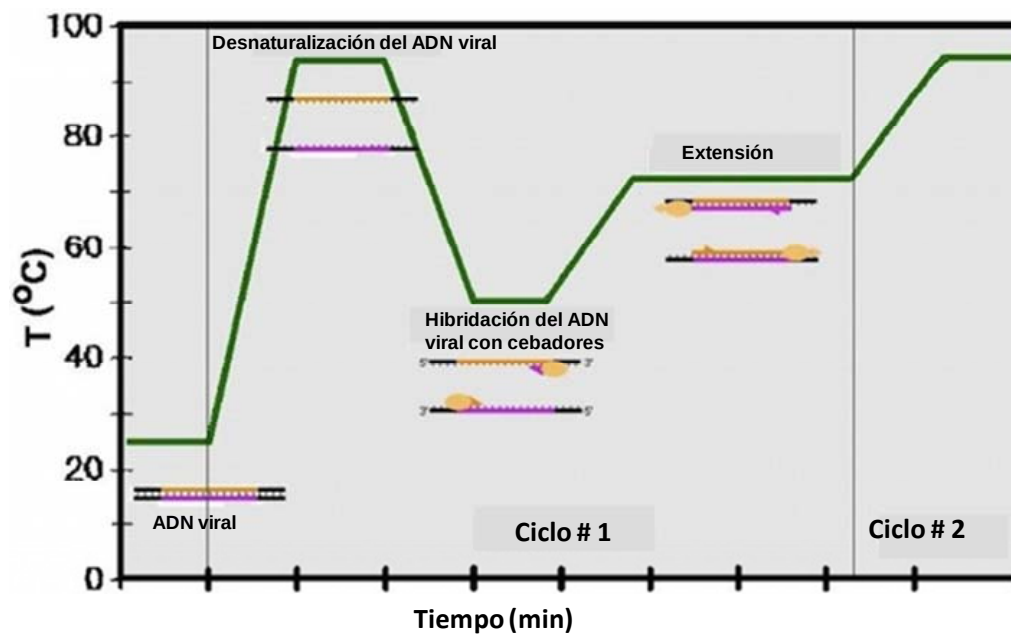
En el programa de amplificación las condiciones de temperatura (desnaturalización, hibridación y extensión), fueron las siguientes:

La desnaturalización inicial se realizó a:

- Desnaturalización: 95°C los 35 ciclos
- Hibridación: 60°C
- Extensión: 72°C

La extensión final fue 72°C durante 3 minutos; cada amplificación incluyó un control positivo y control negativo libre de ADN (68,69).

FIGURA 1. Programade amplificación



La calidad e integridad del producto amplificado por PCR fue analizado mediante electroforesis de ADN en gel de agarosa al 1,3% teñidos con bromuro de

etidio, el ADN viral se observó a través de iluminación con luz UV 302-365nm en el foto documentador Bio Rad Gel Doc mostrando su migración (bandas) en el campo eléctrico de acuerdo a la longitud de la secuencia amplificada. Finalmente para determinar la tipificación del virus VPH el producto amplificado por PCR se sometió a un análisis de dianas para enzimas de restricción (68, 69).

Para la descripción y procesamiento detallado de las muestras por PCR (prueba de biología molecular utilizada) se tomaron en cuenta cuatro etapas:

Primera Etapa: Extracción de la Muestra. La preparación de muestras fue por técnica convencional para biopsia fresca, la cual fue utilizada para el diagnóstico y la tipificación del virus tomando muestras de las regiones antes mencionadas donde hubiese lesiones, previa asepsia de genitales, colocación de ácido acético al 3%, se identificaron las lesiones colposcopicamente y se procedió a realizar exceresis de ellas. El objetivo de esta primera etapa, fue el de realizar la extracción y purificación del DNA mediante el uso de las proteinasa K y de otras soluciones con la finalidad de digerir el tejido celular y así obtener ADN que se utilizará para el montaje de la reacción en cadena polimerasa o PCR (69).

Segunda Etapa: Montaje de PCR. En esta etapa se agregó una cantidad de ADN purificado (muestra) en una mezcla la cual estuvo constituida por Master Mix: compuesta por buffer taq polimerasa, DNTP cloruro de magnesio (quien da la energía a la reacción) primer o cebadores MY9 y MY11 y agua para completar la mezcla. La

muestra más la mezcla se llevó a un vial en un termociclador para amplificar o copiar ADN viral 35 a 40 veces. Es allí donde ocurren todos los pasos de la reacción en cadena polimerasa: desnaturalización a 95°C que consiste en la separación de las cadenas de ADN posteriormente la hibridación de los cebadores MY9 y MY11 de la región de la cápside del virus L1 región de lectura abierta u Open Reading Frame (ORF) que constituye la región común a todo tipo de VPH si existe o no la presencia viral. De ser positivo el ADN viral ocurre el siguiente paso de la extensión o amplificación de las cadenas de DNA viral que representa la base del PCR (69).

Tercera Etapa: Visualización del producto amplificado por separación electroforética, a través, del cual se determinó ADN viral en las muestras examinadas por electroforesis en geles de agarosa al 1.3% teñidos con bromuro de etidio, visualizándose las bandas en un sistema de documentación de geles o transiluminación de luz ultravioleta, detectándose ADN viral cuando las bandas coinciden con la talla de 450 pares de base (pb).

Cuarta Etapa: Tipificación del producto amplificado, se tomó una muestra para realizar la digestión con enzimas de restricción solo a las muestras positivas que permitieron tipificar el VPH en estudio (68, 69).

Una vez corroborado el diagnóstico por medio de los métodos antes mencionados, se procedió realizar el tratamiento.

Segundo momento: tratamiento

El cual consistió en aplicar 2 sesiones de electrocauterios en las zonas con lesiones clínicas en cuello uterino, vagina y vulva con un mes de intervalo entre ambos y 8 quemados químicos con ácido tricloroacético al 80% en cuello, 60% en genitales internos y 50% en externos con intervalo de 15 días entre cada uno, previa reevaluación con colpovideoscopia en cada sesión buscando lesiones clínicas o sub-clínicas del virus.

Se indicó tratamiento reepitalizante posterior a cada sesión, en cada uno de ellos por 7 días. Durante este período se recomendó abstinencia sexual durante 10 a 12 días y uso de métodos de Barrera (preservativos) durante los días de práctica sexual, después de cada quemado local.

Finalizado el tratamiento que duró en promedio de 8 a 9 meses, se indicó Ácido fólico, ácido glicirricínico oral por veintiún días, y tratamiento tópico portresmeses, así como una dieta rica en antioxidantes, evitar consumo de alcohol, hábitos tabáquicos, promiscuidad, anticonceptivos, etc.

Tercer momento: control post tratamiento.

Se realizó evaluación post tratamiento con PCR y colposcopia de las 110 pacientes en estudio a fin de evidenciar la presencia o no de hallazgos compatibles con el virus.

El seguimiento y evaluación post tratamiento se realizó sistemáticamente en cada una de las pacientes en estudio con intervalos semestrales durante año y medio a través de PCR por técnica de cepillado con cito brush en vulva y vagina e hisopado en cuello uterino, resaltando que dichas evaluaciones se realizaron en los mismos sitios o tejidos donde inicialmente fue diagnosticado el virus. Además también se evaluaron colposcopicamente dichas zonas como se señaló anteriormente.

3.4. Técnicas de procesamiento y análisis estadísticos

Para el procesamiento de datos se utilizó procedimientos de la estadística, comparativa correlacional para su cuantificación, tabulación, graficación, análisis y discusión de los resultados obtenidos. Los resultados se expresaron en términos de medias $\pm$ desviación estándar, frecuencias absolutas y relativas. Adicionalmente, los resultados se mostraron en tablas y/o figuras. La comparación de proporciones se realizó a través del test de Mc Nemar y del estadístico Z. Las asociaciones entre las variables se determinaron por medio de la prueba χ^2 . Para la cuantificación de la

sensibilidad y especificidad de los métodos diagnósticos se utilizó el Teorema de Bayes, mientras que la correspondencia de los resultados se evaluó a través del índice Kappa. El nivel de confianza empleado fue de 95% (NC=95%) y los programas estadísticos utilizados fueron SPSS versión 15.0; Statistix versión 6.0 y la hoja de cálculo de Excel.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

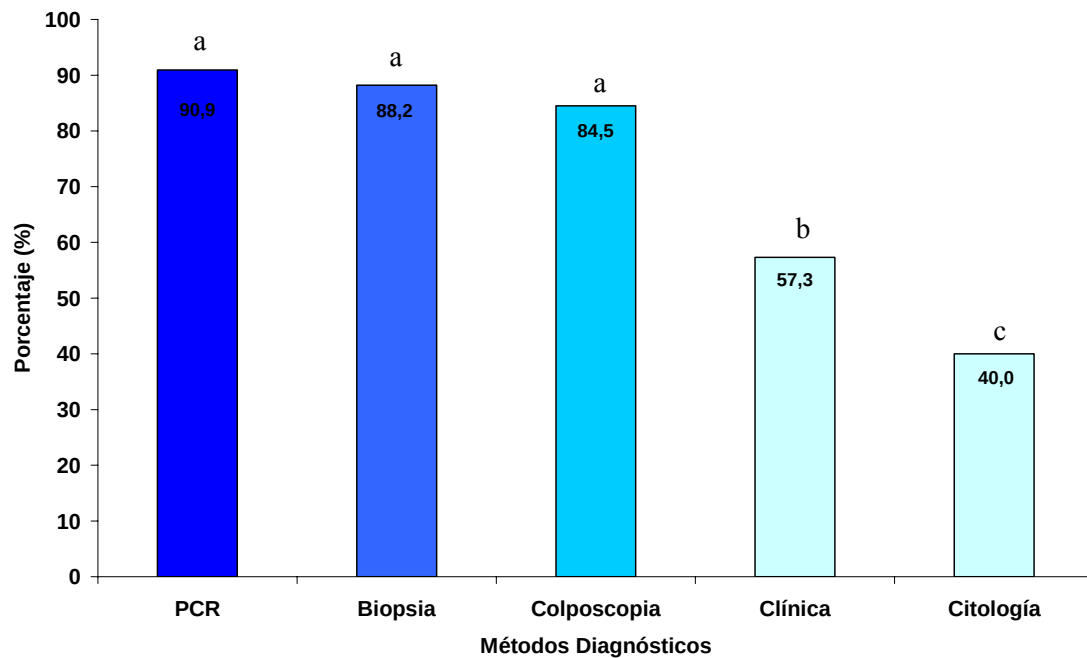
En el presente capítulo se presentan los resultados obtenidos en la investigación. Se evaluaron 110 sujetos del sexo femenino con edades de $26,8 \pm 7,8$ años. La frecuencia absoluta y relativa de infección por VPH hallada en la muestra estudiada según los diferentes métodos diagnósticos empleados se muestra en la Tabla 1 y Gráfico 1.

Tabla 1. Frecuencia absoluta y relativa de infección por VPH según el método diagnóstico empleado.

Método Diagnóstico	n (%)	IC _{95%}
PCR	100 (90,9%)	85,3 - 96,5 %
Biopsia	97 (88,2%)	81,8 - 94,6 %
Colposcopia	93 (84,5%)	77,2 - 91,9 %
Clínica	63 (57,3%)	45,1 - 69,5 %
Citología	44 (40,0%)	25,5 - 54,5 %

Fuente: Richani 2011

Gráfico 1. Frecuencia relativa de infección por virus de VPH según los diferentes métodos diagnósticos empleados. a,b,c: Letras iguales sin diferencia significativa en comparación con PCR y letras diferentes con diferencia significativa en comparación con PCR.



Fuente: Richani 2011

Las frecuencia de infección por VPH detectada por el método de PCR fue significativamente superior a la hallada con la citología ($\chi^2=49,778$; $p=0,000$) y la clínica ($\chi^2=30,140$; $p=0,000$). A pesar que se observó una tendencia a que la frecuencia de infección por VPH detectada por la PCR fuera superior a la reportada por la biopsia y la colposcopia, estas fueron similares ($p > 0,05$).

El índice Kappa para la comparación entre los métodos PCR y Biopsia arrojó un resultado de 0,86 ($p=0,000$) lo cual indica concordancia entre ambos métodos en el reconocimiento de resultados positivos y negativos del virus. La Tabla 2 presenta los resultados obtenidos en la comparación de los resultados empleando los métodos PCR y Biopsia.

Tabla 2. Comparación de resultados obtenidos empleando los métodos diagnósticos PCR y Biopsia

	PCR Positivo	PCR Negativo	Todos
Biopsia Positivo	97	0	97
Biopsia Negativo	3	10	13
Todos	100	10	110

Fuente: Richani 2011

La sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de infección por VPH empleando el análisis de las biopsias y en comparación con la PCR fue de 97% y 100% respectivamente.

Es importante señalar que de los 97 sujetos diagnosticados con infección por virus VPH empleando para ello el diagnóstico de biopsia, 70 (72,2%) presentaron signos de infección por VPH mientras que 27 (27,8%) mostraron condiloma acuminado ($p=0,000$).

Por otra parte, el análisis de concordancia entre los resultados encontrados en el diagnóstico de VPH por los métodos PCR y colposcopia reveló un índice Kappa de 0,46 ($p=0,000$) lo cual indica que existe concordancia entre los resultados positivos y negativos obtenidos por ambos métodos; sin embargo, dicha concordancia es inferior a la mostrada por los métodos PCR y Biopsia. La comparación de resultados obtenidos entre los métodos PCR y colposcopia se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3. Comparación de resultados empleando los métodos PCR y Colposcopia

	PCR Positivo	PCR Negativo	Todos
Colposcopia Positivo	90	3	93
Colposcopia Negativo	10	7	17
Todos	100	10	110

Fuente: Richani 2011

La sensibilidad de la colposcopia en el diagnóstico de la infección por VPH fue de 90%, mientras que la especificidad fue de 70%, en comparación con la PCR.

Hubo independencia en el reconocimiento de resultados positivos y negativos hallados por los métodos PCR y Clínica en el diagnóstico de infección por VPH, el cual se evidenció en la determinación del índice Kappa cuyo valor fue de 0,11

($p=0,067$). La Tabla 4 muestra la comparación de los resultados entre los métodos diagnósticos de infección por VPH encontrados por PCR y Clínica.

Tabla 4. Comparación de resultados empleando los métodos PCR y Clínica

	PCR Positivo	PCR Negativo	Todos
Clínica Positivo	60	3	63
Clínica Negativo	40	7	47
Todos	100	10	110

Fuente: Richani 2011

La sensibilidad y especificidad del método clínico en el diagnóstico de infección de VPH y en comparación con el método PCR fue de 60% y 70%, respectivamente.

Al igual que con el método clínico, se observó independencia en el reconocimiento de los resultados positivos y negativos encontrados por los métodos PCR y Citología en el diagnóstico de infección por VPH ($Kappa=0,03$; $p=0,537$). La comparación de los resultados entre los métodos diagnósticos de infección por VPH PCR y Citología se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Comparación de resultados empleando los métodos PCR y Citología

	PCR Positivo	PCR Negativo	Todos
Citología Positivo	40	4	44
Citología Negativo	60	6	66
Todos	100	10	110

Fuente: Richani 2011

El diagnóstico de infección por VPH empleando la citología reveló una sensibilidad de 40% y una especificidad de 60% al compararla con el método de PCR.

La Tabla 6 muestra en resumen la sensibilidad y especificidad, así como también el índice Kappa de los métodos diagnósticos para infección por el virus de VPH en comparación con el método de PCR.

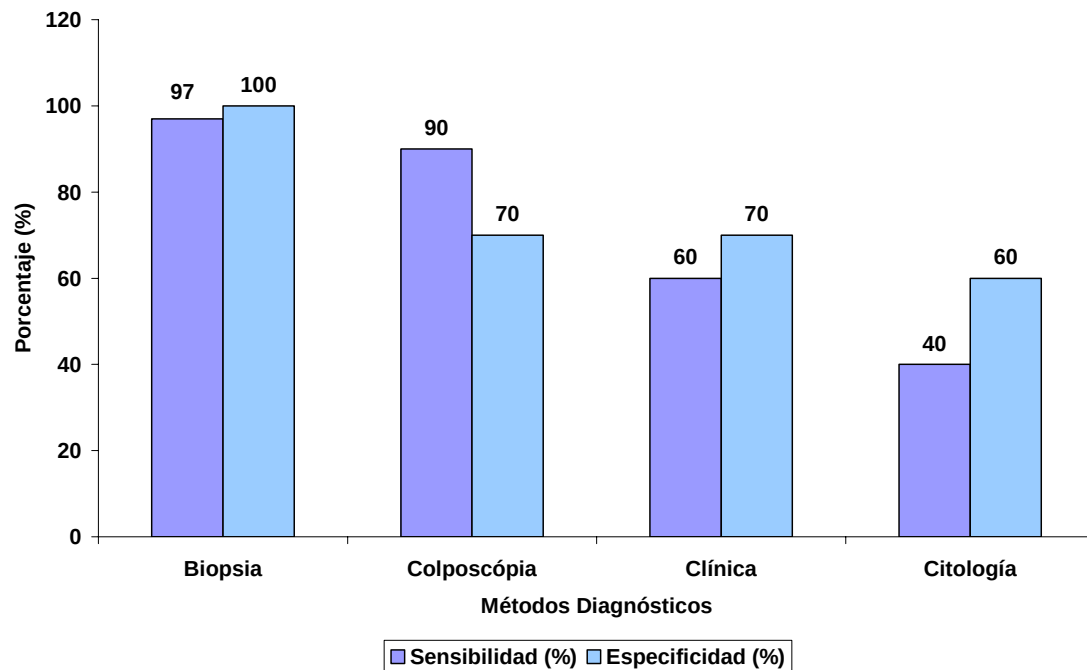
Tabla 6. Sensibilidad, especificidad e índice Kappa de los métodos diagnósticos para infección por virus de VPH en comparación con el método de PCR.

Métodos	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Índice Kappa	<i>p</i>
Biopsia	97,0	100,0	0,86	0,000**
Colposcopia	90,0	70,0	0,46	0,000**
Clínica	60,0	70,0	0,11	0,067
Citología	40,0	60,0	0,03	0,537

Fuente: Richani 2011

** $p < 0,001$

Gráfico 2. Sensibilidad y especificidad de los métodos diagnósticos para infección por virus de VPH en comparación con el método de PCR.



Fuente: Richani 2011

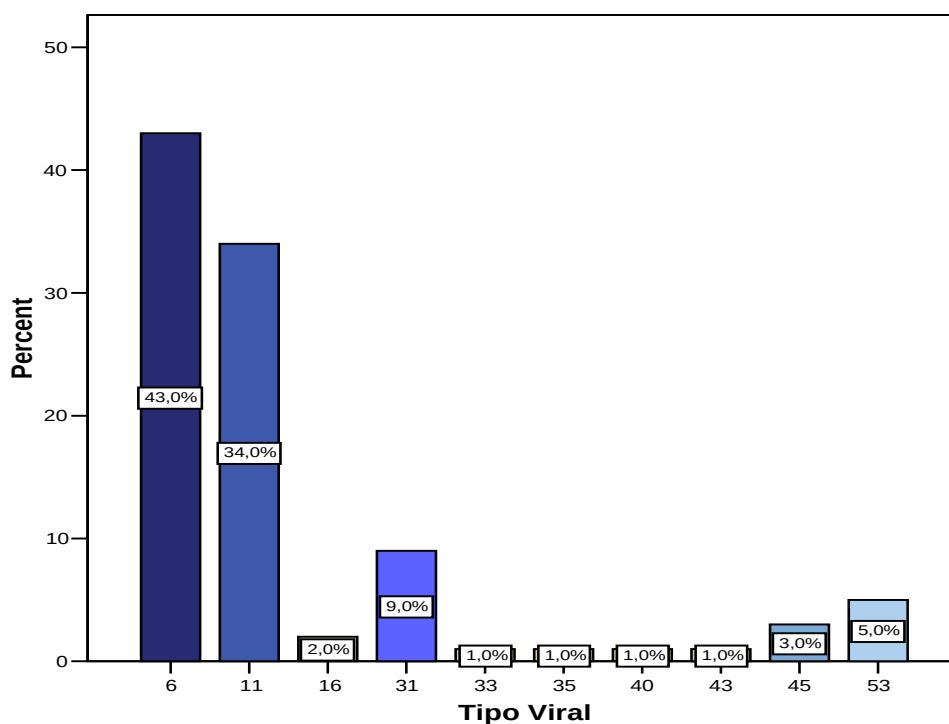
En cuanto a frecuencia de los tipos virales encontrados en los sujetos estudiados, la Tabla 7 muestra dichos resultados. En esta se aprecia una mayor frecuencia de virus VPH tipo 6, mientras que los menos frecuentes fueron los tipos 33, 35, 40 y 43. Adicionalmente, se observó que los tipos virales de bajo riesgo fueron significativamente más frecuentes que los de alto riesgo (88,0% vs 22,0%) ($Z=9,24$; $p=0,000$)

Tabla 7. Frecuencia de tipos virales detectados

Tipo de VPH									
Alto Riesgo					Bajo Riesgo				
16	31	33	35	45	53	6	11	40	43
2(2,0)	9(9,0)	1(1,0)	1(1,0)	3(3,0)	5(5,0)	43(43,0)	34(34,0)	1(1,0)	1(1,0)

Fuente: Richani 2011

Los resultados se expresan en n(%)

Gráfico 3. Frecuencia de tipos virales detectados

Fuente: Richani 2011

En cuanto a los tipos de virus de VPH detectados por grupos de edad, la Tabla 8 revela que en los sujetos más jóvenes, el VPH más frecuente fue el tipo 6 y el menos frecuente resultó ser el tipo 31. Por otra parte, en los sujetos de mayor edad el tipo viral encontrado con mayor frecuencia también fue el 6, mientras que los menos frecuentes fueron los tipos 33, 35 y 40. Adicionalmente, los sujetos de mayor edad presentaron significativamente mayor frecuencia de infección por tipos virales de VPH de alto riesgo que los presentados por los de menor edad (42% vs 2%) ($Z=-4,59$; $p=0,000$), por lo que la infección por virus de alto riesgo se asoció a los sujetos de mayor edad y los de bajo riesgo a los de menor edad ($\chi^2=16,610$; $p=0,000$).

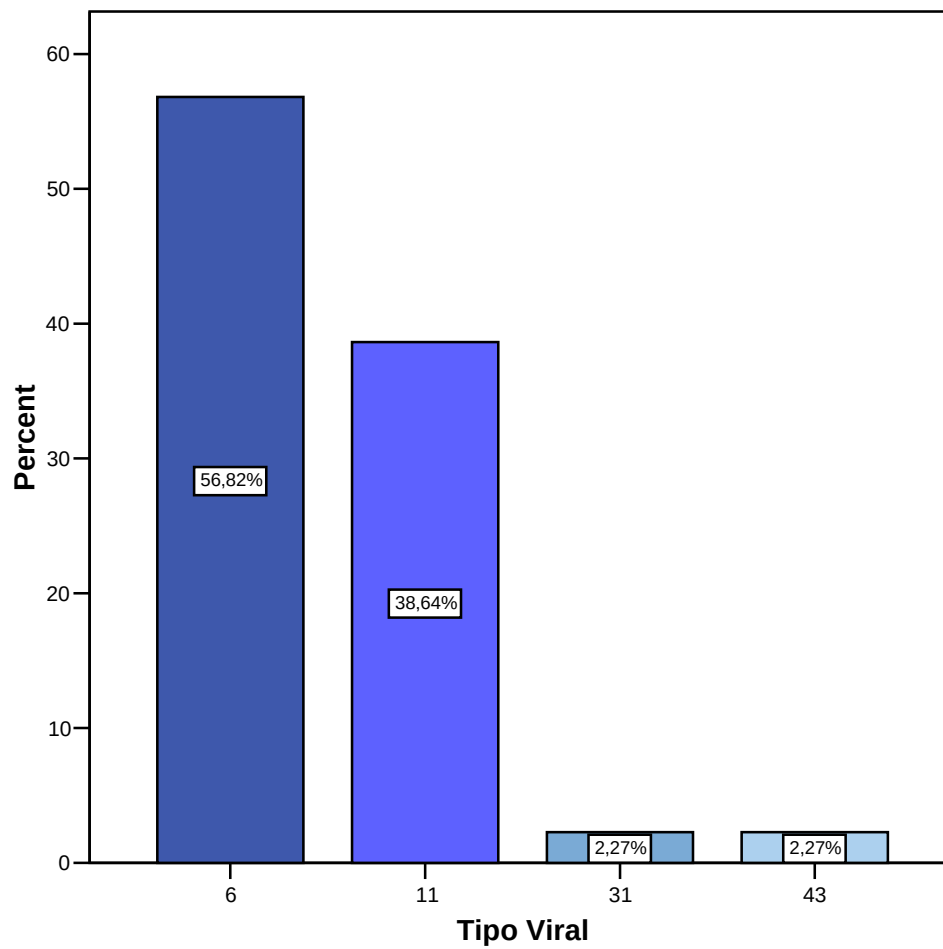
Tabla 8. Frecuencia de tipos virales detectados por grupos de edad

Grupos de Edad	24 años o menos (n=44)	Tipo de VPH	Alto Riesgo	31	1(2,3)
			Bajo Riesgo	6	25(56,8)
				11	17(38,6)
	25 años o más (n=56)	Tipo de VPH	Alto Riesgo	43	1(2,3)
				16	2(3,6)
				31	8(14,3)
				33	1(1,8)
				35	1(1,8)
				45	3(5,4)
				53	5(8,9)
			Bajo Riesgo	6	18(32,1)
				11	17(30,4)
				40	1(1,8)

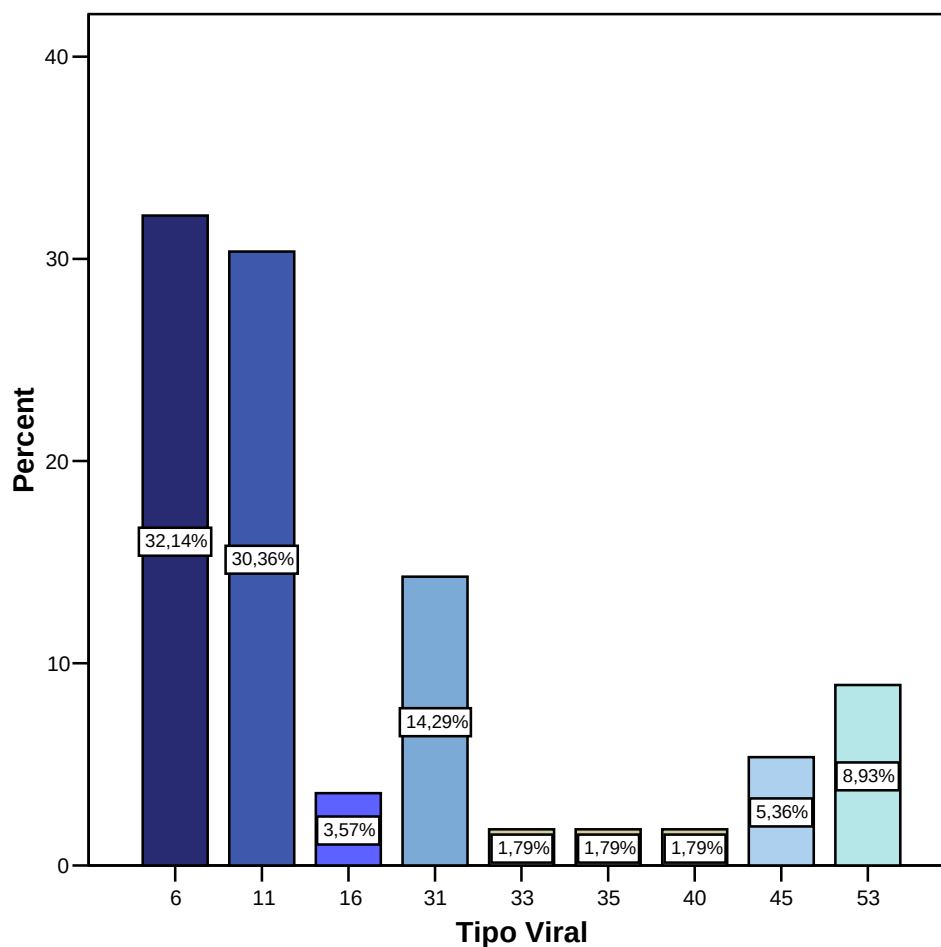
Fuente: Richani 2011

Los resultados se expresan en n(%)

Gráfico 4-A. Tipos virales en sujetos de 24 años o menos



Fuente: Richani 2011

Gráfico 4-B. Tipos virales en sujetos de 25 años o más

Fuente: Richani 2011

Los tipos de VPH detectados en las diferentes etapas de la investigación se presentan en la Tabla 9. En las fases de control post-tratamiento y en la de seguimiento a los 6 meses donde no hubo infección por VPH, mientras que en la fase

de seguimiento a los 12 y 18 meses se encontró en forma respectiva 4 y 16 casos que resultaron positivos para dicha infección.

Tabla 9. Frecuencias absolutas de tipos de VPH presentes en las diferentes etapas de la investigación.

VPH	ETAPAS				
	Diagnóstico	Control Postratamiento	Seguimiento Postratamiento		
			6 meses	12 meses	18 meses
06	43	0	0	1	8
11	34	0	0	2	5
16	2	0	0	0	0
31	9	0	0	0	1
33	1	0	0	0	0
35	1	0	0	0	0
40	1	0	0	0	0
43	1	0	0	0	0
45	3	0	0	1	1
53	5	0	0	0	1
Total	100	0	0	4	16

Fuente: Richani 2011

Es de hacer notar que de los cuatro sujetos a los que se les detectó infección viral en la fase de seguimiento posterior al tratamiento realizado a los 12 meses, solo

uno presentó el mismo tipo viral (Tipo 6) que en la fase de Diagnóstico. De igual forma, en la etapa de seguimiento a los 18 meses a un solo sujeto le fue detectado el mismo tipo viral (Tipo 11) que en la fase de Diagnóstico, mientras que los otros 15 sujetos adquirieron tipos virales diferentes al diagnosticado inicialmente en esta etapa. El resto de las pacientes resultaron negativas para la infección por VPH al año y medio del control y seguimiento.

4.1. Análisis y Discusión

El cáncer de cuello uterino es la neoplasia más frecuente que afecta a la mujer en países sub desarrollados, donde hay una incidencia de más de 40 casos por cada 100 mil mujeres al año; mientras que en países industrializados se observan 10 casos por cada 100 mil mujeres al año. Su identificación precoz es de mucha importancia ya que es curable en estadios tempranos de la enfermedad.

En la evaluación del virus papiloma humano (VPH) a través de diversos métodos diagnósticos se observó en este estudio que el método que permitió la detección con mayor frecuencia fue la PCR 90,9% con un intervalo de confianza entre 85,3 – 96,5%, seguido del diagnóstico por biopsia que detectó el virus en 97 casos (88,2%); la colposcopia diagnosticó el virus en 84,5% a diferencia de la clínica y la citología donde la frecuencia en el diagnóstico del virus fue de 57,3% y 40,00% respectivamente. Estos resultados coinciden con los hallazgos realizados por otros

autores, para diagnóstico por PCR (15, 16, 19, 26,34,39). Igualmente se observó para la detección por biopsia resultados aproximados a los obtenidos en este estudio 99% y 98% (29,30), 80% (32); mientras que otros autores reportaron por este método una frecuencia de 74% y 63% (39, 40), resaltando que estas diferencias podrían atribuirse a la etapa clínica, subclínica o de latencia en la que se tome la muestra, puesto que en la etapa de latencia no se observan los signos histopatológicos característicos para el diagnóstico del virus.

En relación al diagnóstico por colposcopia se detectó resultados similares al nuestro: 77% (39) y diferentes 42,74% (32). En cuanto a lo revisado en la literatura utilizada, con respecto a la citología se observó un consenso general que la misma, represento el método diagnóstico que identificó el virus con menor frecuencia (16, 19,33); con márgenes similares al encontrado en esta investigación. Esto podría atribuirse a la congestión y edema que presentan las células del tejido durante la infección por este virus, ya que el mismo favorece infecciones múltiples cervico vaginales, que impide en ciertas ocasiones determinar los signos sugestivos de esta patología.

Se tomó como método gold estándar a la PCR por ser una prueba de biología molecular que detecta el ADN viral del VPH, aún en la etapa clínica de latencia, momento en el cual desde el punto de vista histopatológico, no se evidencian coilocitos entre otros hallazgos sugestivos por biopsia para infección por VPH,

disminuyendo un poco su sensibilidad (97%) y especificidad (100%) que fue poco significativa en este estudio.

El índice de confianza para la PCR (96,5%) y para la biopsia (94,6%) fueron similares, demostrándose concordancia entre ambos métodos, a través del índice de Kappa 0.86 en el reconocimiento e resultados positivos y negativos, lo que demostró alto índice de sensibilidad y especificidad

En ciertas condiciones la biopsia puede mostrar atipias coilocíticas las cuales pueden ser originadas por procesos inflamatorios causadas por tricomonas, acumulación de glucógenos en las células entre otros (71, 72); lo que podría explicar los casos de falsos positivos.

Al comparar el método PCR y la colposcopia se encontró una concordancia inferior a la mostrada por los métodos de PCR y biopsia, ubicándose la sensibilidad para el método de colposcopia en 90% y 70% de especificidad. Autores señalan en relación a este método para la detección del virus, que es posible identificar lesiones clínicas y subclínicas (acetoblanco) sugestivas de infección por VPH (16, 32, 35,39). En todo caso, esto depende de ciertos factores como la experiencia del especialista en el manejo y uso de la técnica colposcópica siendo realmente útil y de apoyo en el diagnóstico de esta infección. Así mismo otros autores, reportaron en sus estudios

una sensibilidad para la colposcopia del 81% y una especificidad del 77% valores muy similares al nuestro (73).

En relación al método clínico en el diagnóstico de infección por VPH y en comparación con el método Gold standard, la sensibilidad fue del 60% y 70% para la especificidad, en la literatura consultada no se encontraron trabajos que nos permitan comparar estos resultados. En relación a la citología como método diagnóstico en infecciones por virus de VPH este reveló una sensibilidad del 40% y una especificidad del 60% con un análisis de concordancia muy bajo en relación a la PCR. Al consultar la literatura, diversos autores refieren la alta especificidad de este método diagnóstico, no así la sensibilidad del mismo. Un estudio realizado en el 2011, donde se empleó como método de referencia o gold estándar, el estudio histopatológico, el cual dio como resultado que la citología presentaba una sensibilidad del 17,7% y una especificidad del 100%, mientras que la PCR mostró sensibilidad y especificidad del 100% para cada uno de los parámetros de desempeño(74).

Otra investigación realizada en Colombia donde se validó la citología cervico vaginal convencional en la identificación del cáncer invasor escamo celular en 1980 mujeres, y empleando como método de referencia los informes de biopsia, donde se determinó que la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) fueron de 12%, 99%, 83,3% y 98,2% respectivamente (75).

En la presente investigación se empleó como método de referencia para la detección del VPH, al método de biología molecular reacción en cadena de polimerasa (PCR), los resultados obtenidos en esta prueba se compararon con los métodos diagnósticos de biopsia, colposcopia, clínica y citología; los mismos reportaron que la biopsia mostró mayor capacidad en la detección de los verdaderos enfermos (sensibilidad) y sanos (especificidad), seguidos de la colposcopia, la clínica y la citología. Los resultados obtenidos en la presente investigación y específicamente en cuanto a la citología, coinciden con la baja sensibilidad obtenida por otros investigadores (74,75) quienes emplearon como método de referencia el método de biopsia. Sin embargo, la mayoría de los estudios consultados trabajan con frecuencias y comparaciones entre métodos, en todo caso, el consenso final señala la necesidad de utilizar la combinación de diferentes métodos en el diagnóstico de esta infección.

Los tipos virales de bajo riesgo fueron los reportados con mayor frecuencia, de ellos el tipo 6, predominó con un 43% seguido del VPH tipo 11 con un 34%. Esto concuerda ampliamente con lo descrito en las literaturas revisadas (7, 26, 27, 33, 34, 38, 39, 40, 76, 77).

En relación a los tipos virales de alto riesgo oncológico, se reportó con mayor frecuencia el genotipo 31, seguido de los genotipos 53, 45, 16, 33 y 35; observándose similitud en algunos estudios en cuanto al subtipo predominante; pero en la mayoría de otras investigaciones revisadas los tipos 16 y 18 fueron predominantes. Al

comparar estos resultados con los grupos etarios, observamos que los tipos virales de alto riesgo son hallazgos más frecuentes en los grupos de edades superiores a 25 años, siendo en nuestro país el grupo de edad más vulnerable para desarrollar neoplasias del cuello uterino. En la literatura mundial se reporta como subtipos de alto riesgo más frecuentes, los tipos virales 16 18, 33 y 31, los hallazgos en este presente estudio no coinciden con los de la literatura mundial que difiere con los hallazgos encontrados en esta investigación; igualmente se reportó como grupo etario más vulnerable a las mujeres con edades superiores a los 30 años (7, 23, 27, 33, 34, 38, 39, 40, 76, 77,78).

Estos resultados demuestran la importancia del conocimiento de los tipos virales a nivel nacional orientados a la prevención y una vez más muestran la necesidad de implementar programas preventivos de alto impacto que vayan más allá de la toma de citología cervico vaginal, como método diagnóstico aplicado a grandes masas, sino además, que también se utilice como método de diagnóstico de rutina las pruebas de biología molecular en la detección de esta infección. Favoreciendo de este modo la aplicación y creación de vacunas contra el VPH orientadas según los tipos virales encontrados en el país, por lo tanto, es importante conocer la prevalencia geográfica para los diferentes tipos de VPH.

En cuanto a la evaluación y seguimiento de la infección por VPH posterior al tratamiento y a través de controles por PCR, no se detectó carga viral en ninguna de las 110 pacientes post tratamiento, ni en los primeros 6 meses posteriores al mismo.

Caso similar fue reportado por otro investigador, quien observó post tratamiento que 78% de los casos fueron negativos a VPH (79). Así mismo, el control a los 6 meses fue negativo en la detección de ADN viral, resultados similares a los reportados en el estudio “Diagnóstico, evaluación y seguimiento del VPH” (80).

A los 12 meses posteriores al tratamiento, se detectaron 4 casos positivos a la PCR pertenecientes a los sub tipos 6,11 y 45 al comparar estos resultados con los iniciales, solo uno presentó el mismo tipo viral que en la fase diagnóstica (tipo 6), estos casos en la literatura revisada, los describen como enfermedad residual la cual es definida como aquella lesión que se pone de manifiesto en cualesquiera de los controles realizados en el curso de los 12 primeros meses después del tratamiento y habla de fallo terapéutico el cual podría asociarse al tamaño lesional, estado inmunológico o alta carga viral antes del tratamiento (81). Los otros tres casos positivos a la PCR mostraron tipos virales diferentes, los cuales se asocian a reinfecciones por otros sub tipos virales, probablemente asociados al comportamiento sexual de sus parejas o de dichas pacientes, o al mantenimiento de hábitos con contactos indirectos conocidos como fómites (52).

A los 18 meses post tratamiento, 16 pacientes presentaron la PCR positiva, de ellas una sola presentó el mismo tipo viral que tenía en la etapa diagnóstica (tipo 11) lo que pudiese considerarse como una residiva o enfermedad residivante, definida esta como aquella que se presenta después del primer año de seguimiento (82).

Mientras que el resto de las pacientes presentaron infecciones por tipos virales diferentes a los diagnosticados en la fase diagnóstica o reinfecciones.

El 20% de los paciente diagnosticados con VPH y tratados, presentaron PCR positiva para el virus en el curso de los 18 meses post tratamiento, es de importancia clínica identificar el tipo de enfermedad o etapa clínica de la infección a fin de predecir el comportamiento de la infección y actuar de manera asertiva en la prevención del cáncer invasivo.

4.2. Conclusiones

El método diagnóstico utilizado como método de referencia PCR, representó la prueba que detectó la infección por VPH con mayor frecuencia 90,9% con un intervalo de confianza entre 85,3 y 96,5% a diferencia de la citología, cuya frecuencia en la detección del virus fue de 40%, con un intervalo de confianza que osciló entre 25,5 y 54,5%.

La tendencia de la frecuencia en la detección de la infección por VPH para la biopsia y colposcopia fueron similares a la de la PCR: 88,2% y 84,5% respectivamente.

Hubo concordancia entre los métodos PCR y biopsia en el reconocimiento de la infección viral.

En el diagnóstico por biopsia 72,2% de los casos presentaron como diagnóstico histopatológico, signos de infección por virus papiloma humano, mientras que para el 27,8% de los pacientes el diagnóstico fue condiloma acuminado.

La sensibilidad y especificidad para biopsia fue de 97% y 100% respectivamente en relación con el PCR, mientras la colposcopia fue sensible 90% y específica en un 70% en contraste con la citología que resultó ser el método menos sensible 40% y 60% de especificidad.

Las infecciones virales por VPH de bajo riesgo fueron predominantes y los tipos más frecuentemente encontrados en la población en estudio fueron tipo 6 (43%) y 11(34%), esto representó el 78% de los casos. En las infecciones por los subtipos de alto riesgo, el tipo 31 representó el tipo más común, (9%); seguido del tipo 53 (5%), 45% (3%) y 16 (2%).

La infección por VPH de bajo riesgo se localizó con mayor frecuencia en el grupo etario representado por pacientes menores de 24 años, mientras el VPH de alto riesgo se localizó en pacientes mayores de 25 años.

En cuanto al control por PCR, al culminar el tratamiento y a 6 meses post tratamiento, los pacientes fueron negativos a la detección del virus en el tejido, mientras que en el control realizado al año, 4 casos resultaron positivos a la infección por VPH y nuevamente 16 casos al año y medio. En 2 casos de estos, fueron detectados el mismo subtipo viral que se diagnosticó al inicio, hay que hacer la observación de que las parejas de estos sujetos no fueron tratados.

CAPÍTULO V

APORTE EPISTEMICO

La infección por virus de papiloma humano (VPH) se ha convertido en un reto que plantea nuevas formas de diagnóstico, que permitan la elaboración de protocolos de abordaje y seguimiento innovadores para el pronóstico de la infección, en este sentido a luz de los conocimientos generados en esta investigación se plantea el siguiente enunciado teórico: Si la infección por VPH es diagnosticada, tratada y controlada adecuadamente la concepción de la etapa clínica denominada “**latencia viral**” debe ser sustituida por la concepción de enfermedad residual, enfermedad recidivante o reinfección viral según sea el caso, la identificación e interpretación correcta de estas fases de la infección, permitirán la aplicación de protocolos diagnósticos y de tratamientos que permitan disminuir los riesgos para una neoplasia invasiva.

Desde el punto de vista clínico, la infección por VPH se le describe diferentes etapas, de ellas se describe como etapa activa de la enfermedad aquella en la cual existen lesiones visibles por clínica y colposcopia sugestivas de infección por VPH, es posible identificar ADN viral a través de la prueba de reacción en cadena de polimerasas (PCR) y a través del estudio cito e histopatológico se manifiestan signos

sugestivos de la infección además del daño causado por el virus al tejido el cuál varía desde una lesión intraepitelial de bajo grado (LIE BG) o neoplasia intraepitelial de grado 1 (NIC1) a un CA in situ o Invasor. Una vez superada esta fase ya sea en forma espontánea o a través de cuales quiera de los tratamientos disponibles, la infección pasaría a lo que se conoce como etapa o fase de latencia viral, la cual se caracteriza por baja carga viral, desde el punto de vista clínico no existen lesiones visibles, ni cambios citopáticos, ni histopatológicos y desde el punto de vista de la biología molecular el PCR persiste positivo, es decir que solo podríamos identificar la infección a través de la determinación de ADN viral, siendo la biopsia en algunos casos negativa ya que pueden o no estar presentes los cambios histopatológicos patognomónicos sugestivos de la infección, igualmente los estudios citológicos generalmente no reportan la infección.

Esto es lo que tradicionalmente se conoce acerca del comportamiento del virus y sus reacciones en el tejido genital. Una vez analizada la literatura y a la luz de los conocimientos encontrados en esta investigación; queda claro que el tratamiento para la infección por VPH va dirigido a eliminar o disminuir las lesiones que ocasiona el virus sobre el tejido infectado del área genital. Ahora bien, ¿es posible eliminar el virus del tejido?; todo parece indicar que la correcta identificación de la infección por VPH con su posterior tratamiento sobre las lesiones producidas en el tejido podrían minimizar la carga viral acortando el intervalo entre una etapa clínica activa y otra.

Al revisar la literatura, observamos el surgimiento de conceptos fundamentales que nos permiten entender las diferentes manifestaciones del virus dentro del tejido y su posible evolución a lesiones crónicas en el mismo, con mayor riesgo para el desarrollo de neoplasias, estos conceptos son: enfermedad residual, enfermedad residivante y reinfección viral.

En razón a lo expuesto se plantea la estadificación de la enfermedad por VPH de la siguiente forma:

1. **Enfermedad activa:** aquella que se manifiesta en la paciente que no se conoce como portadora de la infección y cuyas manifestaciones clínicas son evidentes al examen ginecológico y a la colposcopia, los resultados de la citología pueden o no demostrar signos de infección por VPH, la biopsia se reporta positiva para la detección histopatológica de infección viral, describiéndose signos característicos para esta infección tales como: coilocitosis, paraqueratosis, hiperqueratosis, atipias nucleares tales como: binucleaciones, hiperchromatismo entre otras. El PCR es capaz de identificar el ADN del virus. En esta etapa es importante la realización de un diagnóstico adecuado por lo que se sugiere que para el mismo se utilicen diferentes métodos diagnósticos, que detecten la infección por este virus, el subtipo viral y la gravedad de las lesiones histopatológicas causadas por el virus en el tejido lo que determinara la elección del tratamiento.

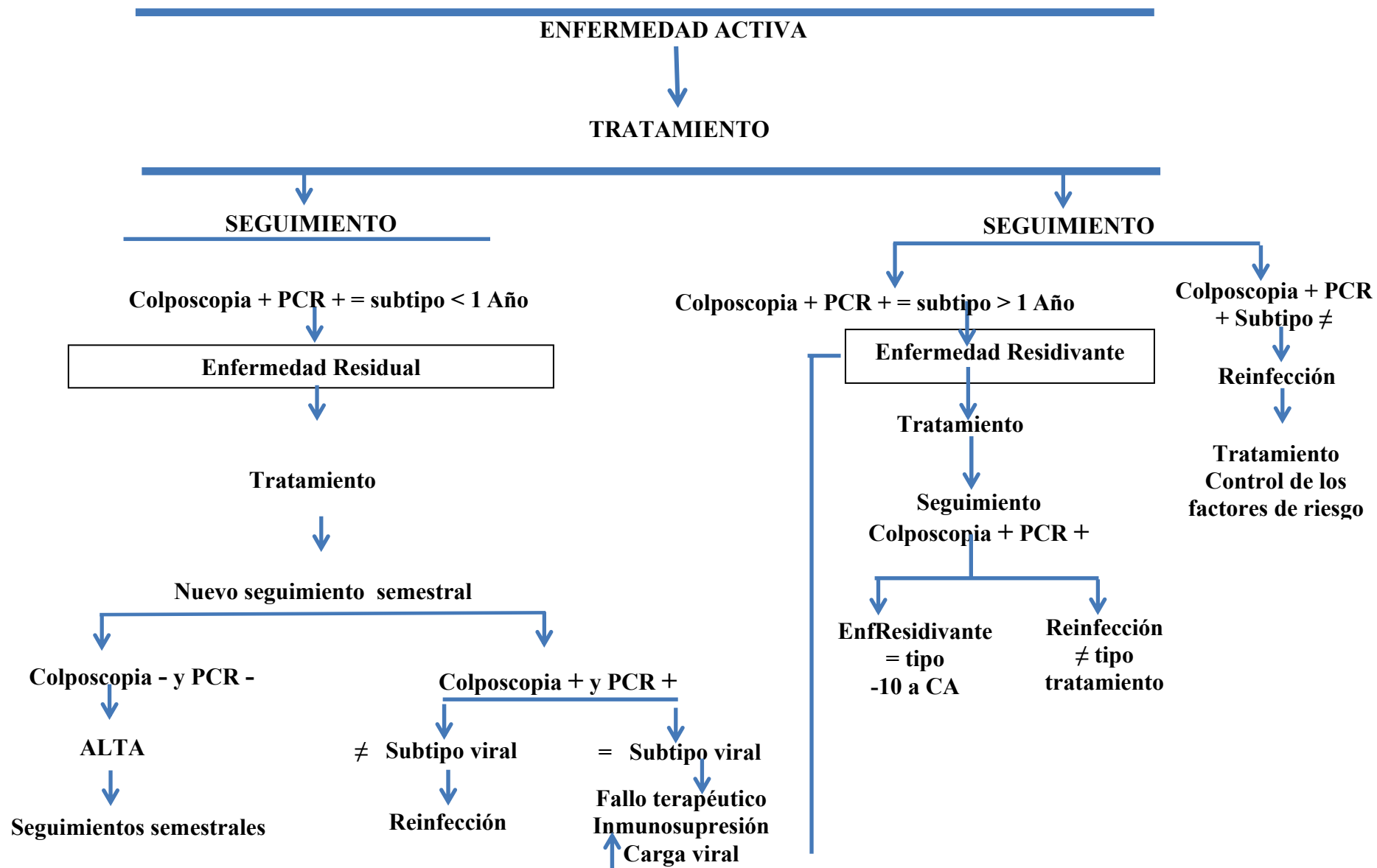
2. **Enfermedad residual:** se define como aquella con lesiones que se ponen de manifiesto en el transcurso de los 12 primeros meses posterior al tratamiento, diagnosticada esta ya sea por clínica o colposcopia y a quien se hace imperativo la realización del ADN viral por PCR. En la literatura se describen una serie de factores que favorecen el riesgo de enfermedad residual entre ellos se destacan: el tamaño de la lesión, el compromiso inmunológico de la paciente, la edad superior a 50 años, alta carga viral antes del tratamiento y afectación de los márgenes de la lesión. La importancia de esta enfermedad radica en la identificación temprana de fallos terapéutico, igualmente se describe un riesgo cinco veces mayor en estas pacientes de desarrollar cáncer invasor en el transcurso de 10 a 20 años en relación a la población general. Se sugiere el seguimiento con colposcopia y PCR, donde éstas deben volverse negativas en el transcurso de los primeros seis meses post tratamiento con riesgo de persistencia lesional prácticamente nulo para este y otros estudios.

3. **Enfermedad residivante:** se define como aquella que se presenta después del primer año de seguimiento con colposcopia y PCR negativos. En este caso es importante la identificación del subtipo viral y así establecer diferencias entre una enfermedad residivante como tal o una reinfección por otro genotipo viral. La importancia de esta enfermedad radica en la persistencia y cronicidad del virus en el tejido, siendo estas pacientes las que presentan mayor riesgo a desarrollar neoplasias invasivas en forma más temprana. En todo caso, es indicativa de persistencia del virus en el tejido.

4. **Reinfección:** se conceptualiza como aquella enfermedad en la cual aparecen lesiones clínicas o sub clínicas posteriores al tratamiento y en donde se identifica ADN viral diferente al sub tipo inicialmente identificado independientemente del tiempo transcurrido post tratamiento. La importancia de esta fase radica en la identificación de riesgo atribuido a la conducta sexual de las pacientes o de sus parejas susceptible de ser modificado. Queda en interrogante la transmisión a través de fómites la cual no puede descartarse en su totalidad, la misma se considera como una transmisión indirecta, descrita en la literatura como contacto indirecto.

Debido a este aporte epistémico se podrá entender la importancia en el abordaje, control y seguimiento de esta infección, para poder comprender la estadificación de la misma, la cual resultaría de gran utilidad en la prevención y pronóstico de esta patología.

PROTOCOLO DE SEGUIMIENTO Y CONTROL DE LA INFECCIÓN POR VIRUS PAPILOMA HUMANO



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Friedrich H. Citodiagnóstico ginecológico. Madrid-España: Editorial Panamericana, S.A. 2005.
2. Álvaro E., Conzuelo Q. Nuevas alternativas en el tratamiento del papiloma virus. México: Editorial Prado S.A. 2002. 1-19, 76-78.
3. Guzmán L, Alcocer J y Madrid M. Perspectivas para el desarrollo de vacunas e inmunoterapia contra cáncer cérvico uterino. Public Salud Pública Méx.1998; 40:38-46.
4. Perea S, López O, García R, Arana M, López P y Ríos M. Impacto del empleo del Interferón Alfa como regulador de la expresión del Virus Papiloma Humano en el cáncer cérvico uterino. Biotecnología Aplicada.1997; 14(3):197-200.
5. Rodríguez ML. Virus Papiloma Humano. Riesgo latente. Salud 2005; 4:17-20.
6. Khan JA. Vaccination for the prevention of cervical intraepithelial neoplasia. N EnglMed 2009; 361:271-278.
7. Milgrom R, Fuenmayor T, Rincón F, Aguilar O y Santimone M. Infección vaginal por Virus Papiloma Humano. GacMéd Caracas. 1998; 106(4):480-490.
8. Ochoa J. Infecciones Dermatológicas. Verrugas virales. Programa de Actualización Continua PAC Dermatología. 1 libro. 4: 25-30. Copyright 2000.
9. Carreras R, Xercavins J, Checa M. Virus del Papiloma Humano y Cáncer de Cuello de Útero. España: Editorial Medica Panamericana, S.A. 2007. 1-35.
10. Ross M, Kaye G y Pawlina W. Histología. Texto y Atlas a color con Biología Celular y Molecular. 4ta Edición. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana, 2004. 403-412.
11. Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, et al. Viral load of human papiloma virus 16 as a determinant for development of cervical cancer in situ: a nested case-control study. Lancet 2000; 355: 2189 - 2193.
12. Correnti M, Cavazza ME, Lozada C, Alfonzo B. Infección por VPH. Un problema de salud pública en Venezuela. Pub Rev Vitae Venez. 2002. 13:1-10.

13. Picconi A, Alonio L, García A. Variantes moleculares de virus papiloma humano (HPV) tipos 16 y 18 en adenocarcinoma de cervix. Pub RevMedArg 2000; 60:889-894
14. Jacobs M., Walboomers,J., Snijders P., Voorhorst, F., Verheijen, R. Franssen-Dan, N. et al. Distribution of 37 mucosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears: the age-related patterns for high-risk and low risk types. Int J Cancer. 2000. 87:221-227
15. Broker TR, Jin G, Croom-Rivers A,Bragg SM, Richardson M, Chow LT, Vermund SH, Alvarez RD, Pappas PG, Squires KE,Hoesley CJ.Viral latency—the papillomavirus model.Dev Biol (Basel). 2001;106:443-51; discussion 452-3, 465-75. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11761260 Consultado Diciembre 2012
16. González L, Berroa G, Hernández E. El virus papiloma humano en la displasia cervical uterina. Pub RevMed Familiar. 2002; 61:48-54.
17. La Cruz C, Di Martino B y Álvarez E. Incidencia de los diferentes tipos de papiloma virus humano (HPV) en las lesiones escamosas del cervix uterino. Pub RevEsp 2003; 36(1):1-9.
18. Amaro F. Comportamiento de algunos factores de riesgo asociados a la aparición de lesiones precancerosas de cérvix. Progresos de obstetricia y ginecología. 2004; 47(7):317-322.
19. Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Frías-Mendivil M, Solorza G, Lizano M. Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas...Salud Pública Méx 2004; Vol. 46(1):7-15. Disponible en: <http://bvs.insp.mx/rsp/articulos/articulo.php?id=000091> Consultado en Diciembre 2013
20. Cañadas M P, Lloveras B, Lorincz A, Ejarque M, Font R, Bosch F. X et al. Evaluación de las técnicas de detección del VPH en los programas de cribado para cáncer de cuello uterino. Salud Pública Méx [revista en la Internet]. 2006 Oct [citado 2014 Jun 11]; 48(5): 373-378. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342006000500003&lng=es.
21. Almonte M., Muñoz N. Carga de canceres asociados con el Virus Papiloma Humano en América Latina. Rev. Per. Ginecol. Obstet. 53 (2): 93-97. 2007

22. Lepe J.A., Sánchez, M. Torrenteras, R. Estudio del virus del papiloma humano en mujeres atendidas en los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío. Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Andalucía. Informe Semanal 06/07/2007; Vol 12, N° 27.
23. Alarcón A, Cervantes A, Meneses T, Castillejos M, Astudillo H, y Tena M. Penoscopia y citología uretral en hombres con parejas que presentan lesiones cervicales por virus del papiloma humano. *GacMédMéx* 2010; 146(4):274-280.
24. Ríos M.A., Hernández, M. Aguilar F., Silveira, P. de Q., Aguilar K. Tipos de Papiloma Virus Humana más frecuentes en muestras cubanas de cáncer cervical. *Rev. Cubana ObstetGinecol.* 2010; 36 (2):1-5.
25. Moreno M. J., Calveiro C E, Dionisi M, Gravina C, Flores J, Cabrera M. Correlación cito-colpo-histológica de lesiones causadas por el virus del papiloma humano (HPV) y la utilidad de la técnica de PCR para determinar la infección por HPV. *HospAeronáut Cent Colon* 479, Ciudad de Córdoba. 2013; 8(1): 38-45. 38-45.
26. Álvarez M, Chiarello A, Espinal E, Reigosa A y Marrero M. Detección y tipificación del virus papiloma humano (VPH) en un grupo de pacientes con sospecha clínica y anatomopatológica de infección por VPH. *Pub RevSalusVenez.* 2000; 4(2).
27. Figueroa F, Ramírez O y Yáñez V. Asociación entre cepas del virus papiloma humano determinadas por reacción en cadena polimerasa y las características de las células infectadas. Trabajo de Grado. Universidad de Carabobo. Valencia -Carabobo. 2000.
28. Sánchez M, Andrade M, Puga C, Jiménez E y González M. Tipificación del virus de papiloma humano y su correlación en la transmisión perinatal. *AnSocObstetGinecolVenez.* 2004; 54:166.
29. Lozada C, Alfonso O, Correnti M, Cavazza M, Ávila M y Pérez M. Detección del virus de papiloma humano en pacientes jóvenes de la Universidad Central de Venezuela. *AnSocObstetGinecolVenez.* 2004; 56:167-168.
30. Serrao T, Millán A y Jiménez R. Correlación Clínica e histopatología en lesiones producidas por VPH en parejas. *AnSocObstetGinecolVenez.* 2004; 57:168-169.
31. González F, Araujo A y Amato R. Lesiones por VPH en hijos de madres portadoras del virus de septiembre 2001 a septiembre 2002. *AnSocObstetGinecolVenez* 2004; 53:166.

32. Somogy L, García M, Ríos C, Forero M, González F y Natera M. Asociación entre neoplasia intracervical e infección por virus papiloma humano (VPH). *AnSocObstetGinecol Venez.* 2004; 55:167.
33. Reigosa A, Álvarez M, De Vasconcelo M, Pérez R, Salas W, Rebolledo V y col. Diagnóstico del virus papiloma humano en cuello uterino de mujeres que acuden a su consulta anual citológica. *Salus* 2004; 8(1):26-30.
34. Graterol I, Finol H y Correnti M. Virus del papiloma humano en lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) de cuello uterino. Tipificación y Ultraestructura. 2005; 36:164-165.
35. Uzcátegui Y, Tovar M, Lorenzo C, González F, García V y Canozo L. Correlación entre patología vaginal, cervical y vulvar. *AnSocObstetGinecolVenez.* 2006; 36:164-165.
36. De Sousa, A., Mata G., Camejo M.I. Citología cervical de trabajadoras sexuales y mujeres del Servicio de Planificación de la Unidad Sanitaria de Los Teques. *Rev. Obstet. Ginecol. Venez.* 2007; 67 (4): 238-245.
37. De Guglielmo Z, Ávila M, Correnti M Veitia D y Cavazza M. Evaluación mediante PCR, de la infección por virus papiloma humano en muestras de pacientes con diagnóstico clínico o citológico. *Pub RevObstetGinecolVenez.* 2008; 68(4):240-247
38. Quintero V M, Cruz G., J F, Bastidas M, Márquez L, Puig P., J. Detección y tipificación de virus del papiloma humano (VPH) mediante PCR- RFLP. *RevObstetGinecolVenez* [revista en la Internet]. 2008 Mar [citado 2014 Jun 11]; 68(1): 25-31. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0048-77322008000100006&lng=es.
39. Somogyi, L., Malpica G., C., Alvarado, B. Virus del Papiloma Humano (VPH) detección y tipificación en la consulta privada. *Rev. ObstetGinecolVenez,* 2010. 70 (3). Pág. 1-10.
40. Pulido A M, Angulo A G, Ávila M, Cavazza M E, Crespo L, Vásquez W, Súnico N. Infección Por El Virus De Papiloma Humano (VPH) En Mujeres: Características Epidemiológicas, Clínicas y Patológicas. *Dermatología Venezolana.* 2011; Vol 49, No 3 y 4 . Disponible en: <http://revista.svderma.org/index.php/ojs/article/view/5> Consultada Diciembre 2013

41. Cáceres M, Quintero M, Cruz J, Bastidas M, Puig J. Identificación de la mutación R579X en el exón 18 del gen RB1, en pacientes con lesiones cervicales asociadas a infección por virus del papiloma humano. *RevObstetGinecolVenez* 2012;72 (4):255-260
42. Nube S y Sánchez M. Compendio metodología cualitativa en educación: Investigación-Acción. *RevCandidus Cuadernos Monográficos*. Venez. 2005; 6(2): 18-22; 73-75.
43. Skjeldestad F, Lie A, Hagen B, Johannessen E, Skarsvag S y Hangen O. Comparison of light microscopy in situ hybridization and polymerase chain reaction for detection of human papillomavirus in histological tissue of cervical intraepithelial neoplasia. *APMIS* 1997; 105:115-120.
44. Gómez ME, Campos A. *Histología y Embriología Bucodental*. 2da Edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana S.A. 2002. 114-127.
45. Zeus M. Detección y tipificación del virus papiloma humano (VPH) en lesiones verrugoso papilares y carcinomas espinocelulares bucales. Trabajo de Ascenso. Centro de Investigación y Documentación (CID). Universidad de Carabobo. Carabobo-Venezuela. 1995
46. Kurman R, Henson D, Herbst A y Schiffman M. Interin guidelines for management of abnormal cervical cytology. The 1992 National Cancer Institute Workshop. *JAMA* 1994; 271:1866-1869.
47. Graces J, Treserra C F y López L. Cuello uterino: Atipias y lesiones premalignas no invasora. *Rev. Obstet. Ginecol. Venez.* 2006; 66(2):81-90.
48. Fernández E, Windscheid O y García R. Verrugas cutáneas. *Guías Clínicas*. España. 2004; 4(21):1-6.
49. Castelazo E. *Enfermedades Sexualmente Transmitidas*. Programa de Actualización Continua PAC Ginecología. 1 Libro 4:35-45. Copyright 2005.
50. Ávila M, Cavazza ME, Vázquez W. Genotipificación del virus papiloma humano en pacientes con condiloma acuminado. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.Venez.* 2008; 28(2): 127-133. 151
51. Díaz ML. Human papiloma virus: Prevention and treatment. *ObstetGynecolClin North A.M.* 2008; 35(2): 199-217.

52. Murray P, Rosenthal K y Pfaller M. Microbiología Médica. 5ta edición. Barcelona-España: Editorial Elsevier 2008. 530-545.
53. Handsfield H. Enfermedades de transmisión sexual. Madrid-España: Editorial Marabán Libros S.L. 2004. 95-96.
54. Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Rocaniello VR y Skalka AM. Principles of virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control. Washington: copyright 2000 ASM PRESS, 2000.
55. Mora de Orta S y Corado J. Inmunología actual. Valencia: Alfa Editores. 2003.
56. Sánchez de la Cruz, B. Ginecología Infanto Juvenil. Buenos Aires: Ed. Medica Panamericana, S.A. 2011. 110-120
57. La infección por VPH: un problema de salud pública en Venezuela. Descubriendo al VPH. VITAE, Academia Bioética Digital. Facultad de Medicina UCV. Octubre-Diciembre 2002: (13). Disponible en: <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=85&m=1&n=3575&e=3576>, Consultado en Mayo 2014
58. Oliveros R, Domínguez A, Malpica C. Principios bioéticos aplicados a la investigación epidemiológica. Acta Bioethica. 2008; 14(1): 90-96.
59. Lolas F, Quezada A y Rodríguez E. Investigación en Salud: Dimensión ética. Santiago de Chile: CIEB, Universidad de Chile, 2006.
60. Aiken L. Test psicológico y evaluación. 8va Edición México: Editorial Prentice Hall hispanoamericana S.A, 1996.
61. Sabino C. El proceso de investigación. Caracas: Editorial Panapos. 2002. 84
62. Ramírez T. Cómo hacer un Proyecto de Investigación. Caracas-Venezuela: Editorial Panapo de Venezuela C.A. 1999. 65.
63. Hammersley M y Atkinson P. El diseño de la investigación; problemas casos y muestras. Etnografía. En: Hammersley M, Atkinson P. Métodos de Investigación. Barcelona: Paidós; 2001. 40-68
64. Daniel WW. Bioestadística. Base para el análisis de las Ciencias de la Salud. 3 ed. México: Limusa, 1997.

65. Apgar B, Brotzman G y Spitzer M. Colposcopia Principios y Práctica. México: Editorial MC Graw Hill interamericana S.A, 2004. 121-251
66. Qian M., Ralston J., Farah J., Grassi M. Surgical Pearc: A rapid one step shave-biopsy technique. J. Am Acad Dermatol.2005; March 52 (3 PT1). 516-7
67. Baliga B.S. Principios y prácticas de la colposcopia. México: Mac GrawHill Interamericana. 2007
68. González F y Martínez B. Técnicas instrumentales en genética forense. Institución “Fernando Católico”. Colección “OrfilaRatger” de Ciencias Forense. 2001; 26-57.
69. PVH Fast. Detección y tipiado del virus papiloma humano mediante identificación genómica. Pharma Gen. S.A. Versión 1.2. 2003.
70. Sierra C. Estrategias para la elaboración de un Proyecto de Investigación. Edición Venezuela: Editorial Insertos Médicos de Venezuela, C.A., 2004. 58-72.
71. Kulasingam SL, Hughes JP, Kiviat NB, Mao C, Weiss NS, Kuypers JM, Koutsky LA. Evaluation of human papilomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. JAMA 2002 Oct 9; 288 (14): 1749-57
72. Baay M, Quint W, Koudstaal J, Hollema H, Duk J, Burger M, Stolz E, Herbrink P. Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. Journal of ClinicalMicrobiology. 1996. 745-747
73. Zertuche, J., Peña A., Díaz J., Vera D. Innovación tecnológica para diagnóstico colposcópico de lesiones por virus de papiloma humano. Rev. SanidMilitMéx. 2013; 67(1): 12-18.
74. Colmenares B, Silva D. Diagnóstico de lesiones intraepiteliales de cuello uterino. Comparación entre citodiagnóstico, biopsia y reacción en cadena de la polimerasa. Informe Médico Sept 2011; Vol. 13 (9) 431-439
75. Arias A, Botero S, Castaño J, Prado J, Díaz, D, Giraldo G, López A., et al hallazgos En la citología vaginal y colposcopia y su asociación con infección por VPH y otros factores de riesgo para cáncer de cérvix en Mujeres atendidas en entidades de Manizales (Colombia), 2000-2007 Universidad de Manizalez, Colombia: Archivos de Medicina (Col), Vol. 10, núm. 2, julio-diciembre, 2010, 151-162

76. Salazar E. Detección del virus papiloma humano en pacientes con lesiones intraepiteliales escamosos de cuello uterino. *Rev. Obstet. Ginecol. Venez.* 2007; 67:47-54.
77. Correnti M, Uribe M y Cavazza M. Detección del virus papiloma humano mediante reacción en cadena polimerasa e hibridación molecular en citología del cuello uterino. Rincón Morales F, Editor. *Ginecol. Venez.* 1996; 115-125.
78. Contreras L, Correnti M, Ávila M, Guerrero A y León A. Virus papiloma humano (VPH) en el contexto ecológico venezolano. (1): Diagnóstico citológico y molecular. *Rev. Salus. Venez.* 2008; 12:(3)39-43.
79. Cortés E, Cercla R, Witvrún J, Sánchez G, Gaspar J y Hernández F. Detección molecular del virus papiloma humano en mujeres con condilomas cervicales tratados con ácido tricloroacético. *Rev. Ginecol. Obstet. Méx.* 2005; 73(3):111-116.
80. Richani H y Castejón O. Diagnóstico, evaluación y seguimiento del comportamiento epitelial latente del virus papiloma humano en pacientes con VPH. *Rev. Electrónica Portales Médicos.com Obstet. Gynecol. Esp.* 2009; 4(7):1-6.
81. Verguts J, Schockaer S, Moerman P. Patologic risk factors for predicting residual disease in subsequent hysterectomy following leepconization. *GynecolOncol.* 2007; Jul: 106 (1). 273.
82. Coloma F, Niguez I, Diago JV, et al. Valor del HPV-DNA como factor pronóstico de recidiva tras conización cervical en pacientes con HSIL. *Rev. EspObstetGinecol* (1). 2004. 39-47

A N E X O S

ANEXO A

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nº: _____

Fecha: ____/____/____

Responsable: HimanRichani, Médico especialista en Obstetricia y Ginecología.

Título: Evaluación a través del diagnóstico y seguimiento de la infección por Virus Papiloma Humano en una población femenina. Se me ha solicitado participar en una investigación, conducente a Grado de Doctor en Ciencias Médicas, bajo las siguientes condiciones:

Yo entiendo que:

1. En este estudio no se realizará ninguna prueba, examen o procedimiento diagnóstico que dañe de ninguna manera o exponga a riesgo alguno mi persona.
2. Cualquier pregunta que yo quiera hacer con relación a mi participación en este estudio deberá ser contestada por la Dra. HimanRichani S.
3. Yo podré retirarme de este estudio en cualquier momento sin dar razones, ni tampoco sin que esto me perjudique.
4. Los resultados de este estudio pueden ser publicados, pero mi nombre o identidad no será revelado y mis datos clínicos y experimentales permanecerán en forma confidencial, a menos que mi identidad sea solicitada por la ley.
5. No recibiré beneficios económicos ni materiales.
6. Mi consentimiento esta dado voluntariamente sin que haya sido forzado (a) u obligado (a).

Investigador Responsable.

Paciente

HimanRichani S.
C.I.: V- 4.794.054

Nombre: _____
C.I.: _____

MSDS: 25857, C M Carabobo: 5006.

ANEXO B**FIGURAS**

Figura1: Lesiones producidas por V.P.H observadas en la cara interna del labio derecho



Fuente: Fotografía tomada por la autora

Figura2: Lesiones vulvares producidas por V.P.H observadas a mayor aumento en la cara interna de labio menor derecho



Fuente: Fotografía tomada por la autora

Figura 3: Lesiones papilomatosas, exofísticas producidas por V.P.H en mucosa interna de labio derecho, uretra y parte superior de labio izquierdo.



Fuente: Fotografía tomada por la autora

Figura 4: Múltiples lesiones papilomatosas y condilomatosas observadas en genitales externos



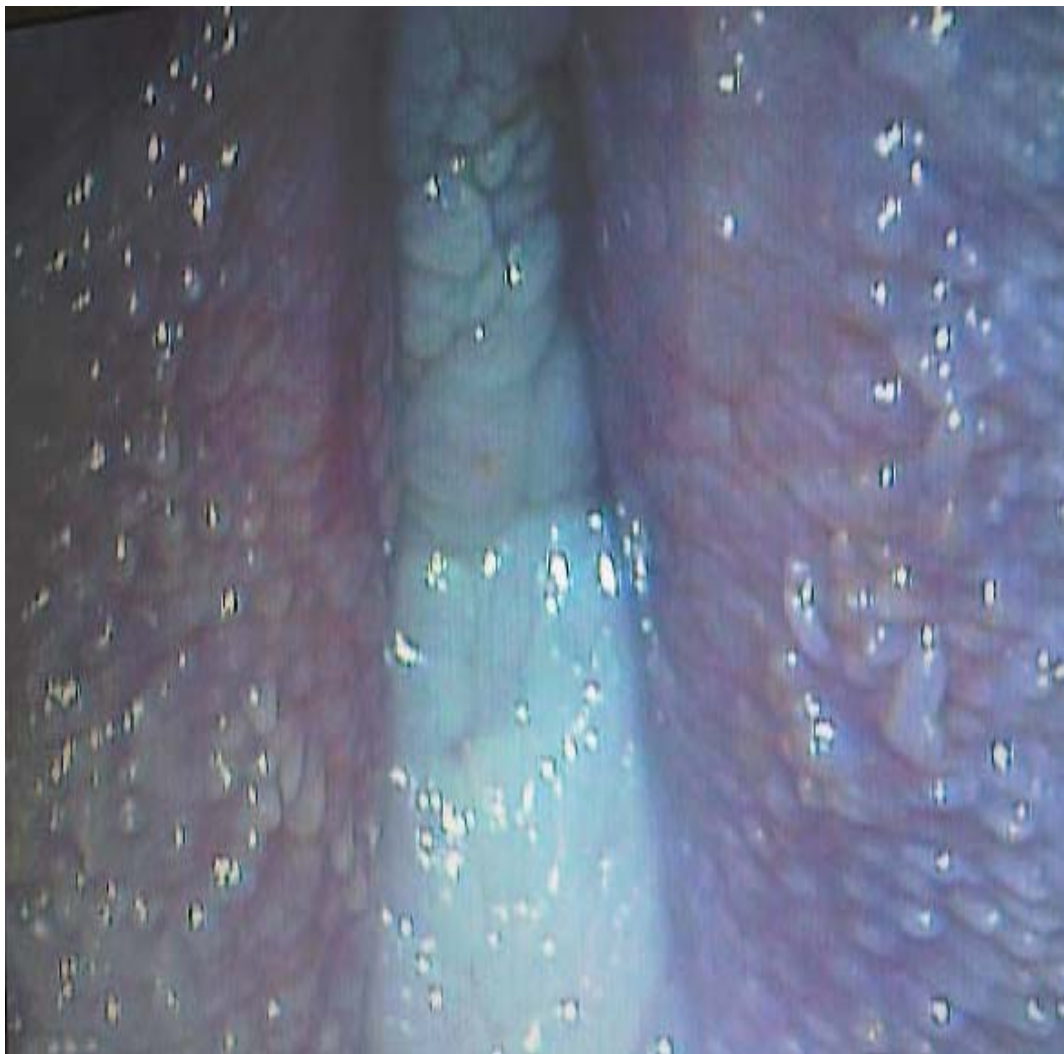
Fuente: Fotografía tomada por la autora

Figura 5: Lesiones clínicas producidas por VPH en cara interna de genitales externos



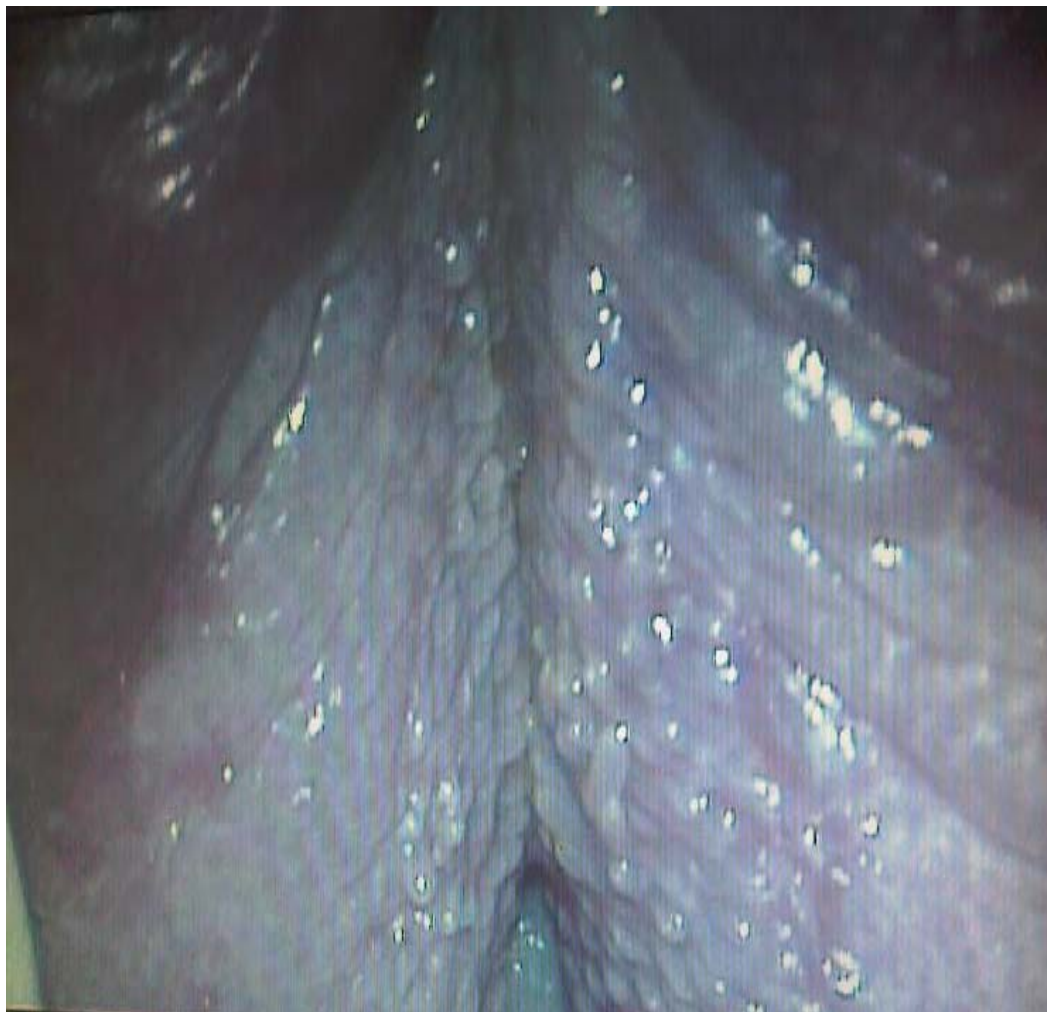
Fotografía: La autora

Figura 6: Lesiones tipo condilomas acuminado en vulva



Fuente: Fotografía tomada por la autora

Figura 7: Signos clínicos de infección por VPH en parte superior de la vulva



Fuente: Fotografía tomada por la autora

Figura 8: Condiloma acuminado en genitales externos



Fuente: Fotografía tomada por la autora

Figura 9: Vulva con lesiones clínicas por VPH, lesiones tipo condilomas.



Fuente: Fotografía tomada por la autora

Figura 10: Lesiones condilomatosas en pared lateral derecha de vagina producidas por V.P.H.



Fuente: Fotografía tomada por la autora

Figura 11: Lesiones producidas por el virus del V.P.H observadas en pared vaginal antero superior e inferior de uretra



Fuente: Fotografía tomada por la autora

Figura 12: Lesiones clínicas producidas por VPH ubicadas en la pared anterior vaginal



Fuente: Fotografía tomada por la autora

Figura 13: Pared antero-superior vaginal con lesiones clínicas definidas del VPH



Fuente: Fotografía tomada por la autora

Figura 14: Lesiones sésiles y papilares múltiples producidas por VPH en pared posterior vaginal



Fuente: Fotografía tomada por la autora

Figura 15: Pared posterior vaginal interna con lesión por VPH en etapa sub-clínica



Fuente: Fotografía tomada por la autora

Figura 16: Cuello uterino sano post-tratamiento



Fuente: Fotografía tomada por la autora