

INFECCIONES VAGINALES EN PACIENTES CON LESIONES
PREMALIGANAS Y MALIGNAS EN CUELLO UTERINO, QUE ASISTEN A LA
CONSULTA DE COLPOSCOPIA EN LA ESE MATERNIDAD RAFAEL CALVO
EN CARTAGENA DE INDIAS 2007-2008

PASANTIA REALIZADA
EN EL GRUPO DE INVESTIGACIONES MICROBIOLOGIA CLINICA Y
AMBIENTAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE
CARTAGENA
CARTAGENA - COLOMBIA

CRISTIAN ALEJANDRO GARRIDO SAAVEDRA.
LUIS FERNANDO VILLEGAS BRAVO.

AREA DE PROFUNDIZACIÓN:
Microbiología

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACION Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA
SINCELEJO – COLOMBIA
2008

INFECCIONES VAGINALES EN PACIENTES CON LESIONES
PREMALIGNAS Y MALIGNAS EN CUELLO UTERINO, QUE ASISTEN A LA
CONSULTA DE COLPOSCOPIA EN LA ESE MATERNIDAD RAFAEL CALVO
EN CARTAGENA DE INDIAS 2007-2008

PASANTIA REALIZADA
EN EL GRUPO DE INVESTIGACIONES MICROBIOLOGIA CLINICA Y
AMBIENTAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE
CARTAGENA
CARTAGENA - COLOMBIA

CRISTIAN ALEJANDRO GARRIDO SAAVEDRA.
LUIS FERNANDO VILLEGAS BRAVO.

DIRECTORA:
BÁRBARA ARROYO SALGADO. M.Sc.
Universidad de Cartagena

CODIRECTOR:
LIA BARRIOS GARCIA MD PATOLOGA.
Universidad de Cartagena

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACION Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA
SINCELEJO – COLOMBIA
2008

“Únicamente los autores son responsables de las ideas expuestas en el presente trabajo” artículo 12 resolución 02 de 2003

Nota de aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Sincelejo, 2008.

A mi adorada madre Lorena Saavedra por todo su esfuerzo en educarme y sacarme adelante y sobre todo por comprenderme y darme todo su amor.....

A mi padre Jaime Garrido por todo su apoyo incondicional

A mi hermano Juan David por su aprecio confianza y en buenos y malos momentos de nuestras vidas

A mis tíos Cristina, Jorge, Elena, Betty y Patricia por quererme, enseñarme a ser mejor persona

A mi querida abuela Cristina Isabel por todos sus valiosos consejos y su cariño

A todos mis amigos que siempre estuvieron conmigo en todo momento

Christian Garrido

El caminar de la vida me ha enseñado que el futuro no se forja solo, sino que uno mismo lo puede forjar; por eso la vida no es importante, lo importante es el sentido que tu le des a la vida, doy gracias a Dios por su inmenso pensamiento para conmigo y enseñanza en mi formación como profesional.

A mi madre Aída Maria Bravo M, por iluminarme y bendecirme desde la otra vida todos los días para salir adelante.

A mi padre Ángel Enrique Villegas E, que sin su esfuerzo no hubiese podido alcanzar este triunfo en mi vida.

A mis tíos Blasina Bravo y Alfredo Acosta, y mis primos Carlos, Adriana, Ana, Edwin y Mabel quienes me animaron, creyeron en mí y me apoyaron incondicionalmente aportando su grano de arena para lograr esta meta.

A mis amigos Edgar Barcenas, Cristo Coley, Hugo Villero, Jhair Anaya, Antonio Almentero, Javier bello, Yamith Martínez, Miguel Díaz, Amaury Romero, José Pájaro, Raúl Anaya y Oscar Montes quienes me dieron su voz de aliento para seguir día a día.

Y gracias a todas aquellas personas que de una u otra manera hicieron posible este logro.

Muchas gracias.

Luis Villegas Bravo.

AGRADECIMIENTOS

El camino para llegar a este momento, el de leer nuestro informe, ha sido largo y lleno de tropiezos, sin embargo, ahora sabemos que todo el esfuerzo ha valido la pena. Con toda certeza, lo mejor ha sido conocer y tratar a personas excepcionales, de todas aprendimos, de todas recibimos una palabra de apoyo. En primer lugar queremos agradecer a Dios por ser nuestro guía espiritual, e iluminarnos en nuestro camino dándonos inteligencia y sabiduría.

Agradecemos a nuestra directora y tutora la Dra. Bárbara Arroyo por su valioso apoyo y por brindarnos la oportunidad de realizar nuestra pasantía.

A Zoraya Rodríguez y Ana Carolina Barreto a quienes no sólo agradecemos todo su apoyo, sino le damos gracias por brindarnos su amistad.

A la nuestra “alma mater” la Universidad de Sucre por brindarnos la formación que nos permite hoy alcanzar el éxito profesional.

A la Universidad de Cartagena por facilitarnos la infraestructura para realizar este proyecto.

Al Sr. Gregorio Young por su colaboración y experiencia en la aplicación de técnicas y procedimientos moleculares.

Al Dr. Orlando Borré por todos sus consejos y enseñanzas en el campo de la ginecología.

A todos los que nos brindaron su amor y confianza e hicieron de nuestra estadía en el laboratorio más placentera: a la Sra. Mayito, Ketty Mendoza Martha Puello, a los Drs. Wilfrido Coronel y Octavio Arzuza, y La Dra. Lía Barrios.

En especial a todos aquellos que nos ayudaron en la realización de este trabajo

GRACIAS.

TABLA DE CONTENIDO

Nota de aceptación.....	4
Firma del presidente del jurado.....	4
Firma del jurado.....	4
PETICIONES PERSONALES	
AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN	10
INTRODUCCION	11
CAPITULO 1. INFORME CRÍTICO.....	16
Ecosistema Vaginal: normal contra Vaginosis Bacteriana	18
METODOLOGÍA.....	20
MUESTREO.....	20
ACOMPañAMIENTO EN LA ESTANDARIZACION DE PROTOCOLOS	
DENTRO DE LA PASANTIA.....	20
A. Preparación de soluciones y reactivos.....	20
B. Análisis de frotis vaginales.....	21
C. Obtención de biopsias.....	22
D. Preparación de tejido y diagnostico histológico.....	23
E. Detección del marcador de progresion P16INK4a por Inmunohistoquímica.....	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
CONCLUSIONES.....	39
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
CAPITULO 2. REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA LITERATURA ACERCA DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO.....	46
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO:	47
FACTORES DE RIESGO PARA LA INFECCION.....	47
ESTRUCTURA DEL VIRUS	49
REPLICACIÓN VIRAL ONCOGÉNESIS.....	52
PROTEÍNAS L1 Y L2.....	57
EL CICLO VIRAL: INFECCIÓN Y DESENSAMBLE DEL VIRIÓN.....	57
MANTENIMIENTO DEL GENOMA	58

FASE PROLIFERATIVA	58
AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA Y SÍNTESIS DE LOS VIRIONES	58
PATOGÉNESIS.....	59
INCIDENCIA Y PREVALENCIA.....	60
TAXONOMÍA.....	62
REGRESION Y PERSISTENCIA.	62
DIAGNOSTICO: CITOLOGICO, HISTOLOGICO, COLPOSCOPICO	
MOLECULAR E INMUNOHISTOQUIMICA	63
VACUNAS PROFILÁCTICAS FRENTE AL VPH.....	64
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	68
ANEXOS	77
ANEXO 1. FORMATO DE ENCUESTA PARA RECOLECCION DE DATOS	77
ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO	80

RESUMEN

El Cáncer de cérvix y sus lesiones precursoras son causadas en su mayoría por *Papillomavirus* (Muñoz *et al.*, 2003), considerado de transmisión sexual (ETS) mientras que otras infecciones como la Vaginosis bacteriana, *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida* y *Herpes simplex virus* podrían llegar a actuar como agentes promotores en la adquisición de la infección y/o de la persistencia del virus. El objetivo de este estudio fue establecer la presencia de infecciones vaginales en lesiones intraepiteliales de bajo, alto grado y cáncer. Fueron seleccionadas 65 pacientes que asisten a consulta de Colposcopia de la Clínica Maternidad Rafael Calvo entre marzo 2007 y marzo 2008, para análisis microbiológico, análisis histológico e inmunohistoquímica por la presencia de lesiones visibles. Se realizaron frotis vaginales incluyendo fresco, gram y KOH. La evaluación histopatológica fue realizada según Agoff (2003) y cada corte histológico clasificado según Richard (NIC I-NIC II Y NIC III) homologada e.g. Bethesda LIE (Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado y de Alto Grado) (Nacional *Cancer Institute workshop*, 1988; modificada 2001). La detección por inmunohistoquímica, estuvo basada en la intensidad y distribución de las células inmunopositivas para el marcador de progresión p16INK4a descritas por Sano (1998,2002). Cortes de 5 µm desparafinizados y rehidratados en diferentes grados de alcohol fueron expuestos al anticuerpo antihumano p16INK4a, clon E6H4 dilución 1:20 (Dako Cytomation), contrastados con Hematoxilina. Estos resultados fueron verificados de acuerdo a los controles de la prueba, usando cortes procesados sin el anticuerpo como controles negativos y cortes de adenocarcinoma utilizados como control positivo para la p16INK4a. Para el análisis estadístico, los datos fueron analizados en el paquete estadístico SPSS 12.0®. Se utilizó el estadístico X^2 para comprobar la relación entre las pruebas microbiológicas y resultados de la biopsia e inmunohistoquímica. De las 65 mujeres, 86.2% presentaron citología anormal. Bajo colposcopia, de las 65 pacientes, el 60% resultaron con lesiones (50.8% LIEBG, 7.7% LIEAG y cáncer 1,5%) y el resto resultaron normales o presentaron lesiones no tumorales. Así mismo, en la biopsia (53/65), 26 (49.5%) presentaron lesiones premalignas o malignas. De estas el 61.53% no presentaron infecciones vaginales. Un aporte preliminar fue que para la inmunohistoquímica el 62,5% fueron positivas. En 19.23% de las pacientes hubo asociación entre lesiones premalignas o maligna y Vaginosis bacteriana. Las infecciones vaginales por *Gardnerella vaginalis*, están presentes en lesiones malignas y premalignas diagnosticadas por biopsia en mujeres de Cartagena de Indias.

Palabras claves: *Papillomavirus*, LIE (Lesión Intraepitelial Escamosa), LIEBG (Lesión Intraepitelial Escamosa de bajo grado), LIEAG (Lesión Intraepitelial Escamosa de alto grado) Vaginosis bacteriana, riesgo oncológico

INTRODUCCION

Las infecciones producidas por el Virus Papiloma Humano (VPH) es una importante enfermedad de transmisión sexual (ETS), con una alta incidencia, y con demostrada asociación al desarrollo de lesiones precancerosas y cancerosas del tracto genital inferior, especialmente del cuello del útero, vulva y región anorectal (Muñoz *et al.*, 2003).

Esta infección también está asociada a vaginosis bacteriana, *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, y otros agentes virales tales como herpes simplex virus, como factor de riesgo implicado en la adquisición de la infección (Watts *et al.*, 2005).

En las últimas décadas, se han descrito más de 150 tipos de VPH que han sido clasificados en 16 grupos. Los VPH de tipo genital se clasifican de acuerdo con el potencial para provocar cambios malignos en el epitelio cervical en tres tipos. De alto riesgo: (16 (9 especies), 18 (7 especies), 31, 33, 35, 38,39, 45, 51, 52, 56, 58, 59,67, 68, 73 y 82), de riesgo intermedio: (26, 53 y 66) y de bajo riesgo: (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108) (Tamayo, 2006, Muñoz *et al.*,2005, Thomison *et al.*, 2008).

El VPH está fuertemente asociado con la neoplasia cervical y su presencia precede y predice el desarrollo de lesiones intraepiteliales escamosas cervicales (LIE), siendo el tipo 16 el más predictivo para LIE de cualquier grado (Liaw *et al.*, 1999; Koutsky *et al.*, 1992). En la mayoría de los estudios que se han hecho a nivel mundial podemos observar la persistencia del tipo VPH 16 en casi todas las lesiones neoplásicas. Aproximadamente en el 50–80% de estos tumores se encuentra el VPH tipo 16 y en el 14–20% el tipo 18; otras de estas lesiones son ocasionadas por otros genotipos de alto riesgo.

En Colombia el cáncer ocupa el tercer lugar como causa de muerte, la neoplasia más frecuente en nuestro país en el sexo femenino es el cáncer de cérvix, considerada como la primera causa de mortalidad. Existen fuertes

evidencias sobre el papel que desempeñan algunos tipos de VPH en el cáncer de cérvix, en mujeres ha aumentado en los últimos años y la infección por VPH es considerada como una enfermedad de transmisión sexual. En el año 1992, en Cartagena se realizó un estudio con el objetivo de buscar VPH en mujeres prostitutas frente a un grupo control. Los resultados no fueron muy concluyentes, sin embargo, se observó presencia de los grupos 18, 16 y 21. Durante el año 2005, 40 mujeres, entre 15 y 35 años, fueron evaluadas con diagnóstico citológico e histológico de Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIE de B.G), en la Unidad de Patología de la E.S.E. Clínica Maternidad Rafael Calvo de Cartagena, con una prevalencia del VPH de 48% (19/40), donde el 15.78% de ellas se les considero como de alto riesgo oncogénico (Perez *et al.*, 2005).

Son muy escasos los trabajos que se han realizado para la búsqueda del VPH en Cartagena de indias, para establecer la prevalencia real del VPH, por lo que se hace necesario identificar ¿cuál es el tipo de HPV más frecuentemente hallado en mujeres con displasias o cáncer de cérvix de la ciudad de Cartagena? y ¿cuáles son los factores asociados para la aparición de cáncer de cuello uterino en esta población?

Se quiere entonces que el conocimiento previo del tipo de virus permita, junto con las demás pruebas (colposcopia e histología), por un lado, prevenir el desarrollo de un futuro cáncer *in situ* o invasor y que de alguna manera, el conocimiento de los factores coadyuvantes nos indique hacia dónde apuntar en materia educacional; y por otro lado, determinar las características epidemiológicas que ayuden a identificar los principales tipos de VPH en esta población, para así poder trabajar en la búsqueda de vacunas que permitan prevenir la aparición o la colonización de tipos de virus de alto riesgo que eventualmente puedan ocasionar cáncer de cérvix (Consuegra *et al.*, 2004).

En la actualidad se están evaluando en el ámbito mundial dos herramientas que podrían mejorar la capacidad de predecir la aparición de lesiones malignas y prevenir su aparición. Estos dos procedimientos son: técnicas moleculares para la detección de la infección por VPH y el desarrollo de vacunas

recombinantes contra esta enfermedad.

Partiendo de la premisa de que si las lesiones precancerosas son detectadas precozmente y tratadas con éxito la mujer no desarrollará cáncer, los programas de detección y control de las lesiones premalignas, son intervenciones costo-efectivas, si son comparadas con el costo que implica tratar el cáncer invasor. Pero se hace necesario que el abordaje terapéutico sea acorde a la verdadera presencia de la infección por VPH, al tipo de lesiones del tracto genital y al riesgo de progresión hacia cáncer. El cáncer cervicouterino representa uno de los pocos cánceres comunes en los cuales se ha identificado un agente causal específico. Sería sumamente útil poder realizar un tamizaje y diagnosticar a las mujeres infectadas por tipos de VPH de alto riesgo, ya que ello facilitaría una vigilancia más estrecha de aquellas persistentemente infectadas, incluso las que tienen una citología normal del cuello uterino.

En consecuencia, los esfuerzos están dirigidos a la búsqueda de métodos rápidos y económicos para la detección del virus, que ofrezcan mediciones excelentes de desempeño. Además, hay en marcha otras investigaciones para identificar marcadores biológicos que permitan predecir en menor tiempo qué pacientes tienen riesgo de presentar lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado. También actualmente se ha adelantado una intensa labor en el terreno de la inmunología del VPH y las interacciones entre virus y huésped, especialmente con miras al desarrollo de vacunas y a la producción de sustancias inmunoterapéuticas (Lewis, 2004).

Esta propuesta está amparada en el proyecto Marco de Detección temprana del marcador P16INK4a, que es considerado un marcador eficaz de progresión en lesiones intraepiteliales escamosas que aparecen asociadas al ADN viral, por inmunohistoquímica (Bibbo, *et al*, 2002; Trunk *et al*, 2004). La expresión de P16INK4a en el epitelio cervical, está relacionada con la infección por VPH y específicamente se expresa en el epitelio que presenta progresión en la neoplasia intraepitelial (Klaes *et al*, 2002; Agoff *et al.*, 2002; Márcia *et al.*, 2005).

La Universidad de Sucre, como institución de educación superior, fomenta la formación científica e investigativa de sus estudiantes, al establecer vínculos interinstitucionales para la cooperación académica complementaria y adquisición de nuevas habilidades, que contribuyan a la formación de un espíritu científico, a través del fortalecimiento de los conocimientos básicos y experimentales de las diferentes metodologías y tópicos de vanguardia aplicados en áreas biotecnológicas, microbiológicas, entre otras.

Para el presente caso, la pasantía fue ofertada dada la existencia del convenio de cooperación vigente entre la Universidad de Sucre y la Universidad de Cartagena, específicamente, la Maestría de Microbiología con su Grupo de Microbiología Clínica y ambiental, reconocido por COLCIENCIAS. Esto nos permitió la oportunidad de realizar un entrenamiento en la estandarización de metodologías diagnósticas microbiológicas durante un periodo de aproximadamente doce meses dentro del marco del proyecto “BÚSQUEDA DEL MARCADOR DE PROGRESIÓN P16INK4a EN LAS LESIONES INTRAEPITELIALES ESCAMOSAS CERVICALES ASOCIADAS A *PAPILLOMAVIRUS* HUMANOS, EN MUJERES DE CARTAGENA DE INDIAS que ofrecía la oportunidad para dicha capacitación.

La pasantía se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Medicina, Laboratorio de Investigaciones de la Maestría en Microbiología E.S.E. MATERNIDAD RAFAEL CALVO y estuvo centrada principalmente en las áreas de Microbiología básica y aplicada.

La pasantía estuvo enmarcada dentro del proyecto de investigación que pretende emplear el marcador de progresión P16INK4a como herramienta para seleccionar pacientes con LIE de bajo grado que ameritan seguimiento y evaluación posterior.

En este sentido el proyecto en mención fue la fuente original científica para establecer el objetivo general de la pasantía:

Profundizar en los conocimientos, teóricos y prácticos, conducentes a la apropiación de conocimientos nuevos, adquisición de habilidades en el manejo

de metodologías microbiológicas en los laboratorios de la Maestría de Microbiología. De igual forma para alcanzar el objetivo general se plantearon unos objetivos específicos:

- Apropiar conocimientos teóricos en los avances de la Microbiología básica y Biología Molecular aplicados a la carrera de Biología.
- Recolección de muestras (frotis vaginales), aprestamiento en la recolección de los mismos, procesamiento, participación en el procedimiento de colposcopia y obtención de biopsia
- Identificar en las biopsia la presencia de lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado, alto grado y carcinoma de cérvix.
- Determinar la asociación entre las variables de edad, número de compañeros sexuales, inicio de vida sexual y tabaquismo con la presencia del marcador en las LIE de bajo y alto grado que ameriten seguimiento y evaluación posterior.
- Participar en el montaje para identificar la presencia de los tipos virus de *Papillomavirus* humanos de alto riesgo oncogénico en las biopsias de las diferentes lesiones cervicales por PCR
- Participar en la estandarización la coloración inmunohistoquímica para P16ink4a, en las diferentes lesiones precursoras y cáncer
- Fortalecer la vocación por la investigación científica.

CAPITULO 1. INFORME CRÍTICO.

La vaginosis bacteriana es una infección cervicovaginal muy común dentro de la consulta ginecológica. Puede estar presente sin evidencia de algún dato clínico, o cursar con incremento del fluido vaginal, lo cual origina malestar en las pacientes. Si no se administra tratamiento, el padecimiento puede tener repercusiones ginecológicas y perinatales. La vaginosis es un síndrome clínico resultado de la sustitución de la flora vaginal normal de lactobacilos productores de peróxido de hidrógeno por altas concentraciones de bacterias anaeróbicas (*Prevotella sp.* y *Mobiluncus sp.*), *Gardnerella vaginalis* y *Mycoplasma homini* (centro de prevención y control de enfermedades 1998). Esta condición se considera la causa más frecuente de descarga vaginal y mal olor, sin embargo la mitad de las mujeres en las que se encuentran criterios clínicos de la entidad se mantienen asintomáticas (Priestley CJ et al 1996).

Flora normal vaginal fue una de las primeras en ser reconocida en 1892 por Döderlein quien describió el patrón normal que se observa en la mujer en edad genital activa. La composición de la flora vaginal depende del contenido de estrógenos. El estímulo hormonal determina la proliferación de las células epiteliales que aumentan su contenido de glucógeno. Este es utilizado por los *Lactobacillus sp.*, siendo el ácido láctico el producto final del metabolismo que ocasiona un descenso del pH, la acidez resultante inhibe a muchas bacterias. En la mujer en edad genital activa, predominan distintas especies de *lactobacilos*, otros bacilos y cocos gram positivos (*Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, etc.) También pueden encontrarse un bajo número de *Actinomyces*, bacilos gram negativos aerobios como bacteroides y distintas especies de enterobacterias, el *Streptococcus agalactiae* se aísla en un porcentaje variable a esta edad. Si bien no suele producir enfermedad en la mujer, su presencia implica riesgo para el recién nacido, en el cual puede causar enfermedades severas.

La flora vaginal normal es un ecosistema dinámico que puede alterarse con facilidad. Las secreciones vaginales tienen una composición que incluye moco cervical, secreciones transudadas a través de la pared vaginal y varía la

cantidad con la edad, la fase del ciclo menstrual, la excitación y la actividad sexual, los contraceptivos, embarazos, frecuencia y estado emocional. Las secreciones vaginales normales se caracterizan por ser: Inodoras, claras o blancas, viscosas, homogéneas o algo floculentas con elementos aglutinados, pH ácido < 4,5, No fluyen durante el examen del espéculo, sin neutrófilos polimorfonucleares (PMNs).

La fisiopatología de la vaginosis bacteriana predominantemente está conformada por lactobacilos productores de peróxido de hidrógeno, los cuales generan grandes cantidades de "ácido láctico", por consiguiente el pH normal de la vagina se encuentra entre 3.5 - 4.5, excepto en el periodo menstrual. Esto permite que haya un balance adecuado de la flora existente, pues se inhibe el desarrollo de bacterias catalasa negativas *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* y otros anaerobios como *Bacteroides bivius*, *B. intermedius*, *Peptostreptococcus*. Cuando se altera la ecología de este microambiente, a través de la disminución o desaparición de la flora lactobacilar se facilita el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias, especialmente esta últimas (schering et al 1998).

Los bacilos producen ácido láctico a partir de la descomposición del glucógeno que se deposita en las células epiteliales de la vagina después de la pubertad. Este proceso hace que el pH normal de la vagina se ubique entre 3.5 - 4.5, excepto durante las menstruaciones, que fomenta el crecimiento de lactobacilos acidofílicos (bacilos anaerobios y facultativamente grampositivos). La vaginosis bacteriana es la más común infección del tracto genital inferior que se encuentra entre las mujeres en edad reproductiva. Esta condición puede considerarse mejor como un síndrome vaginal asociado con una alteración de la flora normal más que una infección específica a algún microorganismo. En la misma, los lactobacilos normalmente predominantes se reemplazan por un conjunto de microorganismos, incluyendo *Gardnerella vaginalis* y anaerobios. Las investigaciones muestran que el 95% de toda la descarga vaginal o infección proviene de 5 condiciones, que en orden de frecuencia son: vaginosis bacteriana, vulvovaginitis por cándida, cervicitis (con frecuencia ocasionada por *Chlamydia trachomatis*, virus Herpes simple o *N. gonorrhoeae*, secreciones normales pero excesivas y vaginitis por

Trichomonas. (Kimberlin *et al* 1998). La candidiasis es la segunda infección vaginal más frecuente en los EE.UU. y la primera en Europa. Las pacientes con infecciones vaginales o cervicales presentan un cuadro clínico con síntomas variados. Se refieren principalmente a una descarga desagradable. Las especies microbiológicas que se encuentran en la vagina de la mujer saludable en edad reproductiva tienen una gran importancia por la producción de peróxido de hidrógeno de los *Lactobacillus spp*. En la flora vaginal normal éstos se encuentran en concentraciones de hasta 10 millones de lactobacilos por mililitro de secreciones vaginales. Mientras que la *Gardnerella vaginalis* puede aislarse en el 5 a 60 % de las mujeres sanas sexual-mente activas, el *Mycoplasma hominis* en el 15-30 % y existen concentraciones balanceadas de organismos facultativos y anaerobios. (Shapova *et al* 1996).

Ecosistema Vaginal: normal contra Vaginosis Bacteriana

Parámetro	Normal	Vaginosis Bacteriana
Presencia de <i>Lactobacilos</i>	Predominante	Escasos
Cantidad de <i>Lactobacilos</i>	< de 10 ⁷ Org/ gr tejido	10 ⁹ org/ gr de tejido
Relación Aerobios/Anaerobios	2 a 5:1	100 a 1000:1
<i>Gardenella Vaginalis</i>	5 a 60%	95%
<i>Mobilucus</i>	0 a 5%	50 a 70%
<i>Micoplasma Hominis</i>	15 a 30%	60 a 75%

Las infecciones de tipo oncogénico como los papilomavirus humanos están altamente asociadas con el desarrollo de cáncer cervical invasivo y precursora de lesiones, denominadas lesiones intraepiteliales escamosa (LIE), o neoplasias intraepitelial cervical (CIN). (Bosch FX, *et al* 2002). Aunque las infecciones por VPH son ampliamente prevalentes, únicamente unas pocas infecciones en mujeres pueden desarrollarse a cáncer cervical. Esto supone un entorno de factores del huésped que envuelven la progresión maligna, incluyendo el estado inmunológico (AL-Saleh W, *et al* 1998), fumar, (Parazzini *et al* 1992) e infecciones de transmisión sexual (Boyle DCM, *et al* 1999). Esto también puede ser una vaginosis bacteriana (VB) o el desarrollo de LIE, desde una microflora anormal que produce nitrosaminas carcinogenicas (Pavic N, *et al* 1984) y estimulan algunas citoquinas, como la interleuquina-1 (Behbakht K, *et al* 2002).

Previos estudios relacionan a las Lesiones Intraepiteliales Escamosas y la Vaginosis Bacteriana en la aparición de lesiones. Una asociación positiva entre la VB y los LIE fue encontrada por algunos investigadores, que muestran algunas mujeres con VB contraen un significativo riesgo de desarrollo de LIE (Guijon F, et al 1992) controversialmente, hay otros estudios encontrados que no muestran una correlación entre BV y LIE (Boyle *et al* 2003).

METODOLOGÍA.

MUESTREO.

Preparación de las muestras. Los estudiantes de la Universidad de Sucre Cristian Garrido Saavedra y Luis Villegas Bravo, adquirieron el compromiso de entrenarse tanto en la transferencia de conocimientos teóricos como prácticos, específicamente en las metodologías diagnósticas utilizadas en el marco del proyecto titulado **“Búsqueda del marcador de progresión p16ink4a en las lesiones intraepiteliales escamosas cervicales asociadas a *Papillomavirus* humanos, en mujeres que asisten a la Maternidad Rafael Calvo de Cartagena de Indias”**. Fueron entrenados en el laboratorio de investigación de la facultad de Medicina de la Universidad de Cartagena. Una vez revisados los protocolos con tutores, procedieron a la recolección de 65 muestras para análisis microbiológico (frotis vaginales), en pacientes que asisten a la consulta de colposcopia de la Clínica Maternidad Rafael Calvo. Incluyendo 40/65 para análisis histológico (Artículo 11 de la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud), molecular e inmunohistoquímico (Estos análisis pertenecientes a la tesis de Maestría en Microbiología), durante el periodo comprendido entre agosto de 2007 a diciembre de 2007. Las muestras y las encuestas fueron registradas y enumeradas de acuerdo a protocolos de laboratorio para su posterior tabulación al igual que el consentimiento informado.

ACOMPañAMIENTO EN LA ESTANDARIZACION DE PROTOCOLOS DENTRO DE LA PASANTIA.

A. Preparación de soluciones y reactivos.

Preparación de solución salina 0,9%: 9 grs de NaCl fueron disueltos en 1 litro de agua destilada, con agitación vigorosa y esterilización por filtración a través de un filtro de 0.2 μ m.

Preparación de solución de KOH 20%: 20grs de KOH fueron adicionados en un litro de agua destilada; con agitación y rotulación con datos de fecha de preparación y caducidad.

Preparación de la solución de formol tamponado al 10%: 500 ml de agua destilada fueron depositados en una probeta y luego fue agregados en un frasco de 1 litro de color ámbar. Se le adicionaron 100ml de formaldehído con una pipeta estéril, e inmediatamente fueron pesados 4 gr de fosfato monobásico de Na que le fueron agregados, hasta la disolución de los cristales. Luego de pesados 6.5gr de fosfato bibásico de Na, también fueron agregados a la solución hasta su disolución. Por último se completó el volumen depositando 400 ml de agua destilada con una probeta y se mide el pH, el cual debe ser de 6.8 – 6.9, para su posterior uso.

B. Análisis de frotis vaginales.

Paciente en posición ginecológica previa especuloscopia, le fue introducido un hisopo estéril con solución salina al 0.9 %, para obtener muestra de secreción cervical, con posterior introducción de este en un tubo que contiene 1.5ml de solución salina para su análisis en fresco. Al mismo tiempo se obtuvieron muestras del cérvix con bajalenguas, que fueron extendidas en placas portaobjetos para luego ser coloreadas con coloración de gram para su posterior lectura en Microscopio óptico (10 aumentos, 40 aumentos y 100 aumentos). Las preparaciones fueron procesadas inmediatamente a fin de lograr la viabilidad de algunos microorganismos en un tiempo menor de dos horas.

La preparación de los reactivos y su estandarización fueron realizadas previamente en el laboratorio bajo los protocolos del Laboratorio de Investigación de Ciencias Básicas Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena. La paciente con resultado de citología anormal, por lo general se encuentra angustiada, por lo que es necesario explicarle detalladamente que el procedimiento es prácticamente indoloro, de corta duración y que ayudará a determinar con precisión un diagnóstico definitivo y que probablemente con un tratamiento conservador sea suficiente para su curación.

C. Obtención de biopsias.

Un total de 40 biopsias fueron obtenidas bajo visión colposcópica realizadas según protocolo establecido por Apgar (2002).

Elaboración de la historia clínica colposcópica. Con la ayuda del ginecólogo y teniendo los antecedentes de importancia, principales factores de riesgo, resultados citológicos, histológicos, tratamientos previos y descripción topográfica sencilla descrita en idioma universal y reproducible realizamos la historia clínica colposcópica seguido de la realización de exploración física completa por parte del ginecólogo.

Visualización del cérvix. Aquí, la presencia de secreciones permiten de alguna forma predecir una posible etiología infecciosa, que justifican la toma de muestra para cultivos y detección de ADN. A través de esta visualización se buscó la presencia de leucoplasia, ulceración o erosión verdadera y apreciar irregularidades de la superficie y vasos macroscópicos.

Aplicación de la solución cloruro de sodio isotónica. Con una torunda de algodón embebida en solución salina, se procede a la eliminación del moco cervical.

Aplicación de ácido acético al 3 o 5%. Fue utilizada preferentemente la aplicación por aspersion, ya que esto permite abarcar zonas amplias de cérvix y vagina, al tiempo que se evita el traumatismo con la torunda de algodón. Esta aplicación ayuda a remover moco cervical, coagular proteínas y alterar la permeabilidad celular.

Solución de Lugol en cérvix. Una vez aplicada en el tercio superior de la vagina podemos correlacionar la topografía de las áreas subclínicas expuestas con el ácido acético y las zonas glucógeno-negativa.

Biopsia dirigida. Las biopsias fueron recolectadas de acuerdo con la topografía y hallazgos colposcopicos. Las muestras recolectadas fueron rotuladas y archivadas en el registro establecido en la investigación y luego transportadas en frascos conteniendo formol al 10% tamponado en un tiempo no menor de 12 horas, para su conservación y depositadas en el Laboratorio de Histotecnología de la facultad de Medicina para su posterior análisis histológico y molecular. Todo el procedimiento anterior fue realizado por el ginecólogo.

D. Preparación de tejido y diagnóstico histológico.

Todos los tejidos biopsiados fueron procesados para la evaluación histológica (n=40). Previa descripción macroscópica individual, cada biopsia fue sometida al procesador de tejidos automatizado (TECHNICON), donde se deshidrata con alcoholes a diferentes concentraciones, se aclara con xilol y por último estos tejidos se embeben en parafina. Los tejidos previamente embebidos se incluyen en moldes para la formación de bloques de parafina, los cuales serán cortados a 5µm y coloreados con Hematoxilina & Eosina. Los bloques previamente rotulados y las láminas con los cortes histológicos fueron archivados en el laboratorio de Histotecnología de la facultad de Medicina de la Universidad de Cartagena. La evaluación histopatológica, bajo el microscopio óptico de luz estuvo a cargo de un patólogo, y se realizó según las recomendaciones operativas estándar para estos procedimientos. Los hallazgos histológicos en el epitelio crevical tales como las lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado, alto grado y carcinoma cervical fueron descritas y diagnosticadas según e.g. Bethesda (Nacional *Cáncer Institute workshop*, 1988; modificada 2001).

Protocolo coloración hematoxilina & eosina: Se introdujo la canastilla con los tejidos en tres recipientes consecutivos de xilol por 10 minutos cada uno para que se de el proceso de desparafinación, seguidamente se pasan a tres recipientes consecutivos de alcohol al 96% 80% y 70% respectivamente por 10 minutos cada uno, posteriormente se hace un lavado con agua de grifo por 5 minutos y terminado ese tiempo se introducen en un recipiente con hematoxilina por 5 minutos y se lavan nuevamente y se procede a decolorarlos en un recipiente con alcohol ácido (100 ml de alcohol 96% y un ml de ácido clorhídrico) por unos segundos hasta bajar un poco la intensidad del colorante; inmediatamente se lavan por 5 minutos, para estabilizar el colorante inmediatamente se introduce en un recipiente con agua amoniaca, se enjuaga rápidamente con agua de grifo y se introducen en un recipiente con eosina por unos segundos, se enjuaga nuevamente con agua de grifo por 1 minuto para luego pasarlos por 3 baños de deshidratación en 3 alcoholes crecientes al 70% 80% y 96% respectivamente y de manera muy rápida,

además se pasan por un cuarto recipiente con una solución de 70% de Xilol y 30% de alcohol por 1 minuto, se escurre unos segundos y se pasan por tres recipientes consecutivos con xilol de manera rápida para el aclaramiento de las mismas. Coloreados con hematoxilina & eosina los bloques previamente rotulados y las láminas con los cortes histológicos serán archivados en el laboratorio de Histotecnología de la Universidad de Cartagena.

E. Detección del marcador de progresion P16INK4a por Inmunohistoquímica.

a. *Preparación de Buffer de lavado PBS:* 10 ml de Buffer + 90 ml de agua destilada pasar para frasco lavador y agitar suavemente por 15 minutos y guardar en la nevera.

b. *Batería de Coloración: Aclaramiento:* Se utilizan dos recipientes con xilol a la misma concentración durante 5 minutos.

c. *Deshidratación:* Se utilizan tres recipientes con alcohol durante tres minutos cada uno sin agitar, estos alcoholes son alcoholes de concentraciones decrecientes (96%, 80%, 70%). Lavar con agua destilada y con solución pre recuperadora por 30 segundos. Pasar al Coplin con el recuperador antigénico "Target Retrival Solution" suficiente para que cubra los tejidos.

c. *Olla Recuperadora Antigénica de Pascal:* Se llena con agua corriente hasta que cubra 1/3 del coplin, se tapa y se lleva a una temperatura de 125°C y una presión de 20 – 22 Psi, cuando se alcanza esta temperatura se detiene y se espera que descienda a 90°C, podemos agilizar el proceso sacando la olla interna y se espera que se enfríe un poco el coplin.

d. *Cámara Húmeda:* Panera con papel absorbente humedecido en el fondo. Sacar de la solución recuperadora y pasar rápidamente al coplin con agua destilada. Enseguida se limpia el exceso de agua destilada y se agrega directo al tejido una gota de peroxido de hidrógeno al 3% para que bloqueen las peroxidases y se introducen en la cámara húmeda por 10 minutos. Se sacan de la cámara húmeda y se lavan con la solución de buffer de lavado PBS teniendo cuidado de no arrastrar el tejido y se pasan al coplin con solución buffer se sacan y se eliminan los excesos de buffer y se agrega el anticuerpo primario por 30 minutos y nuevamente se meten en la cámara húmeda. Se lava con Buffer PBS para retirar el exceso de anticuerpo y se ponen en el coplin. Se

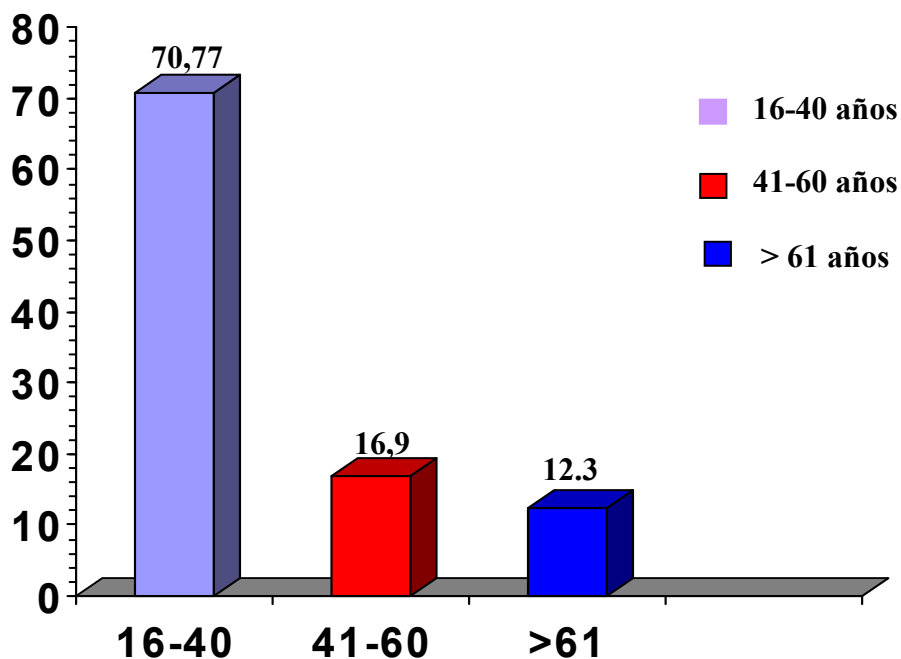
aplica una gota de anticuerpo secundario o ligador biotinilado, se retira el buffer de la muestra y se colocan en la cámara húmeda por 30 minutos. Se lava nuevamente con buffer y se pasa al coplin y se retira el exceso de buffer. Se aplica una gota de anticuerpo terciario "Streptavidina" sobre el tejido y sigue en cámara húmeda por 30 minutos, se lava con buffer para retirar el exceso de buffer.

e. *Preparación de Cromógeno:* 1 ml de Buffer sustrato mas una gota de diaminobencidina y se aplica con un gotero sobre el tejido y se deja por 5 minutos. El sobrante y lo que escurre por las placas se inactiva con hipoclorito. Se pasan las láminas al coplin con agua destilada, se lavan y se contrasta con hematoxilina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

De las pacientes que asisten a la consulta externa de colposcopia en la Maternidad Rafael Calvo se les realizó análisis colposcópico, histológico e inmunohistoquímico. 65 mujeres fueron aptas para ser incluidas en el estudio, cuya edad promedio corresponde $\bar{X} = 40.15$, el 70.77% corresponden al rango de edad de 16-40 años (edad sexualmente activa), 16,92% para edades de 41-60 años y 12,30% para un rango de edad de mayores de 61 años. (Grafica1). Este dato fue tenido en cuenta en el estudio por la presencia de LIEs y DNA de *Papillomavirus*, asociado a la edad de las pacientes que guardan relaciones significativas con la alta prevalencia de infección por VPH en edades mayores, con frecuencias menores en las jóvenes, este comportamiento podría explicarse por el tiempo necesario para desarrollar neoplasia cervical, una vez se ha infectado con el VPH y la reactivación de una infección latente con VPH o que la posibilidad de identificación de VPH haya aumentado en la medida que los cambios atróficos posmenopáusicos ocurren en el tejido del cuello uterino. (Sierra et al., 2006; Ferreccio et al., 2005; Muñoz et al., 2004; San Jose et al., 2003; Herrero et al., 2000; Melkert et al., 1993).

El 95% de las mujeres pertenecen a un nivel socioeconómico bajo, cerca del 18% de ellas manifiestan ser farmacodependientes; solo el 7.7% manifiesta ser fumadora mientras que el 67.7% ha tenido más de un parto, este último dato es similar a lo descrito por Sierra (2006) y Castellsague (2003) donde la multiparidad ha sido asociada con un mayor riesgo de neoplasia cervical. La gran mayoría de las pacientes no utilizaban métodos de planificación; al igual que el procedimiento de ligadura de trompas (salpingectomía) con un 40% cada una, mientras que los anticonceptivos orales son utilizados por un 7.7% de las pacientes; así como el 6.2% de ellas planifica por medio de anticonceptivos inyectables. Este comportamiento podría explicarse por el alto porcentaje de las pacientes con un nivel socioeconómico bajo, sumado a niveles educativos inferiores, por lo tanto ignoran el uso de anticonceptivos.



Grafica 1. Rango de edad de mujeres que asisten a la Maternidad Rafael Calvo de Cartagena de Indias en el periodo comprendido entre marzo 2007 y marzo 2008

En cuanto a la conducta sexual, el 56.9% de las pacientes solo han tenido un solo compañero sexual, mientras que un 33.9% de las pacientes han tenido varios compañeros sexuales y solo el 7.7% afirma que sus relaciones sexuales también son del tipo oralgenitales (tabla 1).

Debido a que este estudio está en su etapa preliminar, la tabulación de los factores de riesgo contra la infección de VPH y otros agentes no ha concluido. No se podrían realizar asociaciones significativas.

De acuerdo a los análisis microbiológicos de las pacientes incluidas 19.23% presentaron asociación entre lesiones premalignas o maligna y vaginosis bacteriana, destacándose *Gardnerella vaginalis* con un 21,5% y *Lactobacillus sp.* 63.1%. *G vaginalis*, es un patógeno asociado a neoplasia intraepitelial cervical así como causante de un alto porcentajes de inflamación pélvica entre otros (Wiese *et al.*, 2000). (Tabla 2).

Nivel socioeconómico	n	%
❖ Bajo	62	95,4
❖ Medio	2	3,1
❖ Alto	1	1,5
Farmacodependencia	n	%
❖ No	53	81,5
❖ Si	12	18,5
Tabaquismo	n	%
❖ No	60	92,3
❖ Si	5	7,7
Multiparidad	n	%
❖ Solo un parto	10	15,4
❖ Mas de un parto	44	67,7
❖ No Contesta	11	16,9
Método de planificación	n	%
❖ Ninguno	26	40,0
❖ Anticonceptivos inyectables	4	6,2
❖ Anticonceptivos orales	5	7,7
❖ Ritmo	3	4,6
❖ DIU	1	1,5
❖ Salpin	26	40,0
Promiscuidad	n	%
❖ Solo un compañero sexual	37	56,9
❖ Mas de un compañero sexual	24	33,9
❖ No Contesta	4	6,2
Tipo de relación sexual	n	%
❖ Genital –Genital	60	92,3
❖ Oral –Genital	5	7,7

Tabla 1. Características de las mujeres de las mujeres que asisten a la Consulta externa de colposcopia de la Maternidad Rafael Calvo Cartagena de indias, en el periodo comprendido entre marzo 2007 y marzo 2008.

Así mismo en el 86.2% de mujeres que presentaron citología anormal fueron vistos *Candida sp* y *Mobiluncus.sp* y la presencia de *Lactobacillus sp.* estuvo asociada a citologías negativas.

Es importante revisar que *Gardnerella vaginalis* al igual que *Bacteroides sp*, *Mobiluncus sp*, y *Mycoplasma hominis* hacen parte de la flora predominantemente anaeróbica de la vagina, a diferencia de los *Lactobacillus sp*. Que son aeróbicos (Fitzhugh and Heller, 2008). Bajo circunstancias normales, los lactobacilos producen un medio ácido en la vagina por la producción del peróxido de hidrógeno, que transforma el glicógeno al ácido láctico. Este ácido láctico suprime el crecimiento de otros organismos especialmente patógenos. Sin embargo, si el equilibrio se inclina lejos de los lactobacilos, son substituidos por los anaerobios (Fitzhugh and Heller, 2008; Tokyol *et al.*, 2004; Vardar *et al.*, 2002).

Estudios anteriores de la flora vaginal en mujeres sanas han demostrado porcentajes del 25% para *Gardnerella vaginalis*, y 10 - 15% para *Candida sp*. Es posible que la presencia de vaginosis bacteriana pueda aumentar la predisposición a la infección por VPH?. Podría decirse, que estaría muy ligado a los factores riesgo de infección por VPH, aunque son bien conocidos, terminan alterando la flora vaginal, y de esta manera jugar un papel en la predisposición a esta infección. Por otra parte, no hay datos en la literatura que indiquen que la infección por VPH podría favorecer el crecimiento de *Gardnerella vaginalis*. La literatura nos muestra que la vaginosis bacteriana está relacionada con VPH desarrollándose displasia cervical, este problema en las pacientes con Vaginosis bacteriana es dos veces mayor que el riesgo normal; debido a una concentración anormal de nitrosamidas, estas son potentes carcinógenos humanos relacionados con grandes cantidades de muchas especies de bacterias anaerobias. (Rodriguez *et al.*, 1996).

A su vez, 6 (9.2%), presentaron *Candida sp*, considerado el patógeno más común asociado a infecciones vaginales y mayor visto en las citologías cervicovaginales. *Candida sp*. Se ha encontrado en aproximadamente el 25% de los pacientes con infección por VPH. (Voog *et al* 1995).

Según Voog, planteó la posibilidad de que la co-infección por *Candida* VPH puede activarse y estar en una fase de latencia. Estudios de la flora vaginal en

mujeres sanas han demostrado porcentajes del 25% para *Gardnerella vaginalis*, y 10 a 15% para *Candida sp.* Esto nos llevó a la pregunta que si las mujeres que poseen *Gardnerella vaginalis* en la flora vaginal podrían tener una mayor predisposición a la infección por VPH. Esto se debe a los factores de riesgo de infección por VPH que ya son bien conocidos forman alteraciones en la flora vaginal, lo cual podrían tener un papel en la predisposición a esta infección. Por otra parte, no hay datos en la literatura que indica que la infección por VPH podría favorecer el crecimiento de *Gardnerella vaginalis* en la flora vaginal. Sugirió que la vaginosis bacteriana de alguna forma está relacionada con el desarrollo de la CIN, es decir, como un cofactor para el VPH. (Caballero *et al* 2000).

Un dato importante fue la asociación de *Gardnerella vaginalis* – *Candida* y *Gardnerella vaginalis* - *Tricomonas* (Tabla 2). Sean estas de transmisión sexual o no, pueden tener importancia en la proliferación de células asociadas a VPH. Probablemente esto se produce a través de un aumento de la humedad en el ambiente vaginal.

Frotis fresco	n	%
❖ <i>Gardnerella vaginalis</i>	14	21,5
❖ <i>Candida</i>	6	9,2
❖ <i>Candida</i> + <i>Gardnerella</i>	2	3,07
❖ <i>Tricomonas.</i> + <i>Gardnerella v.</i>	1	1,5
❖ <i>Mobiluncus</i>	1	1,5
❖ <i>Lactobacillus sp.</i>	41	63,1
Total	65	100,0

Tabla 2. Resultados del frotis vaginal de las mujeres que asisten a la Consulta externa de colposcopia de la Maternidad Rafael Calvo Cartagena de indias, en el periodo comprendido entre marzo 2007 y marzo 2008.

Los resultados de las pacientes con relación a la presencia del virus del papiloma humano (VPH) fue negativo en un 92.3%, indicando que esta población no tenia ningún riesgo frente a este virus; mientras que la proporción de casos positivos frente al VPH fue de 7.7%. El porcentaje de la lectura de los frotis vaginales donde se encontraron *G. vaginalis* fue de 23.7%, no hubo

presencia de VPH. En la flora normal lactobacilar en la gran mayoría no hubo presencia de VPH y su porcentaje es de 56.92, mientras que si lo hubo en un 6.15% de la flora normal y en *candida* sp 1.53% (Tabla 3).

frotis fresco	presencia del virus del papiloma humano		Total
	Negativo n (%)	Positivo n (%)	
❖ Gardnerella	15 (23.07)	0 (0)	15
❖ Candida	5 (7.69)	1 (1.53)	6
❖ Candida + gardnerella	2 (3.07)	0	2
❖ Mobiluncus	1 (1.53)	0	1
❖ Flora nativa	37 (56.92)	4 (6.15)	41
Total	60 (92,3)	5 (7,7)	65

Tabla 3. Comparación de Resultados del frotis vaginal y la prueba del virus de papiloma humano de las mujeres con citología anormal que asisten a la Maternidad Rafael Calvo de Cartagena de indias.

De las 65 mujeres en estudio bajo el diagnostico de colposcopia; 39 pacientes mostraron el 60% resultando con lesiones 33 pacientes con LIEBG (50.8%) 5 pacientes con LIEAG (7.7%) y un paciente con cáncer (1.5%) y el resto de las 26 pacientes se distribuyó en normales o presentaron lesiones no tumorales en un 40%: 14 pacientes con cervicitis (21.5%), 5 pacientes con metaplasia escamosa (7.7%), 7 pacientes normales (10.8%). Así mismo considerando la biopsia (53/65) como prueba patrón, 40 pacientes mostraron un porcentaje del 76.9 (LIEBG), 12 pacientes con LIEBG (23.6%) y un paciente con cáncer (1.5%). Por ultimo el diagnostico de la citología: 56 pacientes resultaron positivos con un porcentaje del 86.2; resultando 14 pacientes con Gardnerella Vaginalis (21.5%), 6 pacientes con *Candida Sp* (9.23%), Una Paciente con *Mobiluncus* (1.5%), 34 pacientes con flora lactobacilar (52.3%) y una paciente con asociación de microorganismos *Candida Sp – G. Vaginalis* (1.5%), mientras que 9 pacientes fueron negativos con un (13.8%) mostrando 7 pacientes con flora normal (10.76%) y una paciente con *G. Vaginalis* y otra paciente con asociación de *G. Vaginalis - Candida Sp*, ambas con 1.5% (Tabla 4).

Frotis fresco	Resultado de citología		Resultado de la colposcopia					Resultado de la biopsia		
	Negativo n (%)	Positivo n (%)	LIE de bajo grado n (%)	LIE de alto grado n (%)	Cervicitis n (%)	Metaplasia escamosa n (%)	Cáncer n (%)	Normal n (%)	Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado n (%)	Lesión intraepitelial escamosa de alto grado n (%)
Gardnerella	1 (1.53)	14 (21.53)	8 (12.3)	0 (0,0)	7 (10.76)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	12 (18.46)	2 (3.07)
Candida	0 (0,0)	6 (9.23)	5 (7.69)	0 (0,0)	1 (1.53)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (7.69)	1 (1.53)
Candida + gardnerella	1 (1.53)	1 (1.53)	1 (1.53)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1.53)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1.53)	1 (1.53)
Mobiluncus	0 (0,0)	1 (1.53)	1 (1.53)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1.53)	0 (0,0)
Flora nativa	7 (10.76)	34 (52.30)	18 (27.69)	5 (7.69)	6 (9.23)	4 (6.15)	1 (1.53)	7 (10.76)	21 (32.3)	8 (12.3)
Total	9 (13,8)	56 (86,2)	33 (50,8)	5 (7,7)	14 (21,5)	5 (7,7)	1 (1,5)	7 (10,8)	40 (76,9)	12 (23,3).

Tabla 4. Comparación de resultados de frotis vaginal vs. Citología, Colposcopia, Biopsia

La flora vaginal, en las mujeres adultas (edad reproductiva) está conformada en su mayoría por bacterias gram positivas, como es el caso de los *Lactobacilos* y los *Corynebacterium sp*, estas son reemplazados por un grupo de bacterias aeróbicas o anaeróbicas, como las *Gardnerellas* y los *Mobiluncus*, las *Trichomonas* y las *Candidas sp*, que en diversas circunstancias provocan un mal olor vaginal y puede decirse que de alguna u otra manera hay una relación con VPH, generando primero una vaginosis bacteriana donde los *Lactobacilos* aparecen en la pubertad y declinan al disminuir la actividad hormonal, en la vaginosis bacteriana no ocurre un proceso inflamatorio verdadero debido a que no hay migración de glóbulos blancos, enrojecimiento o hinchazón de la vagina; Por consiguiente el término vaginitis fue considerado incorrecto y se propuso vaginosis y la enfermedad se nombró correctamente: vaginosis bacteriana. (Weström L., Evaldson G., 1998)

Tras la realización de la tinción de gram, las muestras fueron evaluadas en el microscopio con objetivo de 100x, y observando cinco campos visuales consecutivos; para el diagnóstico se emplearon los criterios de Nugent, que se basan en la obtención de una puntuación en función de la proporción relativa de diferentes morfotipos bacterianos en los frotis vaginales:

1. Flora Nativa, bacilos largos gram positivos (*Lactobacilos*)
2. Cocobacilos gram negativos o gram variables (*Gardnerellas*)
3. Hongos (*Candidas Sp*)
4. Asociación polimicrobiana (*Candidas Sp + Gardnerellas*)
5. Bacilos gram negativos o gran variables curvos (*Mobiluncus*)

Se valorizaron los cinco morfotipos citados. La cuantificación de cada morfotipo se determinó siguiendo el protocolo explicado a continuación:

- 0+: ≤ 1 microorganismos por campo
- 1+: 2-5 microorganismos por campo
- 2+: 6-10 microorganismos por campo
- 3+: 11-15 microorganismos por campo
- 4+: ≥ 16 microorganismos por campo

Siguiendo este método, la puntuación se realizó como se explica en la (tabla 5). Las puntuaciones de cada morfotipo se sumaron para dar un valor final que es el que se empleó para el diagnóstico. Las muestras del 0 a 3 se calificaron como frotis normal, de 4 a 6 como frotis intermedio y del 7 al 10 como vaginosis bacteriana. Por lo tanto una puntuación de cero corresponde a una flora mayoritariamente constituida por *Lactobacilos*, y una puntuación de diez a una flora caracterizada por el reemplazo de *Lactobacilos* por *Gardnerellas vaginalis*, *Candida sp* y *Mobiluncus*.

MORFOTIPOS	n Total	Puntos
4+ Gardnerellas	0	4
3 + Gardnerellas	10	3
2 + Gardnerellas	5	2
1 + Gardnerellas	0	1
0 + Gardnerellas	0	0
4+ Candidas	0	4
3 + Candidas	0	3
2 + Candidas	2	2
1 + Candidas	4	1
0 + Candidas	0	0
4+ Candidas + Gardnerellas	0	4
3 + Candidas + Gardnerellas	0	3
2 + Candidas + Gardnerellas	2	2
1 + Candidas + Gardnerellas	0	1
0 + Candidas + Gardnerellas	0	0
2 - 3 + Mobiluncus	1	2
0 – 1 + Mobiluncus	0	1
4+ Flora nativa	0	0
3 + Flora nativa	8	1
2 + Flora nativa	18	2
1 + Flora nativa	15	3
0 + Flora nativa	0	4

Tabla 5: Puntuación de la tinción de GRAM para el diagnóstico de VB

Criterios de Nugent: 0+: ≤ 1 microorg x c; 1+: 2-5 Microorg x c; 2+: 6-10 microorg x c; 3+: 11-15 microorg x c; 4+: ≥ 16 microorg x c.

Según Amsel y sus colaboradores en el año de 1983, el aspecto del flujo debe ser blanco homogéneo, pH vaginal $> 4,5$; presencia de células guías (10 – 20% de las células epiteliales vaginales), test amino positivo y se dice que hay unos factores que influyen en la disminución de la flora vaginal normal, tal es el caso de la actividad sexual, semen, la contaminación de la flora rectal, el uso de DIU y antibióticos que hacen disminuir la producción de ácido láctico y que aumente el pH, de esta forma se produce un desequilibrio en la flora vaginal normal (Hay P. *et al* 1992).

Se puede entender como vaginosis bacteriana el cambio en el ecosistema vaginal en el que su flora normal está ausente o ampliamente reducida y reemplazada por otra flora predominante de bacterias anaeróbicas, fúngicas y parasitarias (Platz *et al* 1993). Según Kinghorn en 1998 el diagnóstico de otras infecciones genitales que atacan en un 32% a los hombres y el 61% a las mujeres presentan lesiones condilomatosas, el 29% de estos hombres y el 28% de estas mujeres presentan al mismo tiempo enfermedades de transmisión sexual. Se han detectado infecciones por VPH mediante PCR en un 30,5% de las pacientes a causa de los síntomas, o para el tratamiento de algunas enfermedades de transmisión sexual, la infección por *Candida sp* se ha encontrado en aproximadamente el 25% de las pacientes con infección por VPH (Strand *et al* 1993) (Voog *et al* 1995).

La vaginosis bacteriana (VB) es una de las infecciones vaginales más comunes en las mujeres en edad sexualmente activas. En nuestro estudio se utilizaron cuatro criterios clínicos de Amsel para el diagnóstico de VB. La presencia de células guía y la prueba de aminas con KOH al 20%, son los mejores indicadores de VB. Se diagnosticó VB a las pacientes quienes presentaron células guía en un número mayor de 11 microorganismos por campo o como mínimo en el rango de 2-5 microorganismos por campo, la prueba de aminas positiva de las pacientes se caracterizaba por tener un olor a pescado fétido, pH mayor de 4.5 y secreción vaginal adherente (amarillento grisáceo). En este

estudio el 23.06% de las pacientes con VB tuvieron presencia de células guía, el 26.15% tuvieron prueba de aminas positiva.

De las 65 pacientes (muestra total) hubieron 7 casos (10.76%) con VB y 27 pacientes (41.53%) sin VB quienes presentaron secreción vaginal transparente homogénea, junto a 8 pacientes (12.30%) con infección vaginal que mostraban una secreción vaginal adherente y 7 pacientes (10.76%) que no mostraban infección bacteriana, siendo estos dos tipos de secreción las mas frecuentes encontradas en ambos grupos. Una concentración de células guía de 2-5 microorganismos por campo estuvo presente en 8 pacientes (12.3%) con VB y en 5 pacientes (7.69%) sin VB. En cuanto al pH el rango de VB fue de 5-7 en 20 pacientes (30.76%) y las que no tenían infección microbiana fueron 23 pacientes (35.38%), la prueba de aminas fue positiva en 17 pacientes (26.15%) y en 48 pacientes sin historia de VB, correspondiente (73.84%) (Tabla 6).

SECRECIÓN VAGINAL	VAGINOSIS BACTERIANA	
	n total = 65	
	Positivo	Negativo
	n (%)	n (%)
• Tipo de secreción		
✓ Transparente homogénea (normal)	7 (10,76)	27 (41, 53)
✓ Viscosa (flocular)	0 (0)	7 (10,76)
✓ Grumosa (leche cuajada)	2 (3,07)	4 (6,7)
✓ Espumosa	2 (3,07)	1 (1,53)
Adherente (amarillenta – grisácea)	8 (12,30)	7 (10,76)
• Concentración celular guías		
✓ ≤ 1 microorg x campo	0 (0)	43 (66,15)
✓ 2 – 5 microorg x campo	8 (12,30)	5 (7,69)
✓ 6 – 10 microorg x campo	5 (7,69)	2 (3,07)
✓ 11-15 microorg x campo	2 (3,07)	0 (0)
✓ ≥ 16 microorg x campo	0 (0)	0 (0)
• pH		
✓ 2 – 4	0 (0)	20 (30, 76)
✓ 5 -7	20 (30,76)	23 (35,38)
✓ 8 - 10	0 (0)	2 (3,07)
• Prueba de aminas	17 (26,15)	48 (73,84)

Tabla 6: Características de la secreción vaginal, según criterios de Amsel.

La prueba inmunohistoquímica para la búsqueda del marcador de progresión p16INK4a y el análisis molecular para investigar la presencia del VPH, un aporte preliminar fue la positividad del marcador p16INK4a en un 62.5% de las pacientes analizadas. Al igual que presencia del virus del papiloma humano con un total de 5 casos positivos hasta la fecha. De estos apartes no se mostraran resultados finales y discusión puesto que son datos que pertenecen a la Tesis de Maestría en Microbiología de la Universidad de Cartagena del Doctor Álvaro Álvarez Coneo, y todavía no han sido presentados a la Maestría de Microbiología, su carácter es privado, y constituyen propiedad intelectual del

investigador principal y su tesista, de la investigación del proyecto Marco donde se encuentra enmarcada la pasantía.

Para finalizar, el objetivo primordial de la pasantía era establecer la relación existente entre la presencia de lesiones intraepiteliales de bajo grado y las infecciones vaginales, mas o menos el 19.23% de las pacientes, hubo asociación entre lesiones premalignas o maligna y vaginosis bacteriana.

Es importante resaltar la presencia de infecciones vaginales ocasionadas por *Gardnerella vaginalis*, y destacar que este microorganismo juega un papel importante en la etiología de la aparición de lesiones malignas y premalignas diagnosticadas por biopsia en mujeres de Cartagena de Indias

CONCLUSIONES.

La vaginosis bacteriana no es un síndrome nuevo, pero sí una enfermedad ya reconocida. Es el tipo de infección vaginal más común en todo el mundo entre las mujeres en edad reproductiva y representa cuando menos 1/3 de todas las infecciones vulvovaginales.

La vaginosis bacteriana no es provocada por un patógeno único sino que es un síndrome clínico polimicrobiano que se distingue por una secreción vaginal anormal y una alteración de la ecología microbiana normal de la vagina con desplazamiento de la flora lactóbacilar. Aún cuando no se entiende por completo la patogénesis y la transmisión de VB, es posible en la actualidad hacer un diagnóstico exacto en base a la presencia de cuando menos 3 de los 4 criterios clínicos propuestos por *Amsel* y col. descarga homogénea; pH superior a 4.5; prueba de "olor aminado" positiva y presencia de células indicadoras (guías).

Los datos presentados en esta investigación muestran que existe una asociación la presencia de lesiones intraepiteliales de bajo grado y las infecciones vaginales, existiendo una clara asociación entre lesiones premalignas o malignas y vaginosis bacteriana.

Para una mejor comprensión de la fisiología vaginal y la posible relación directa o indirecta entre agentes virales y *Gardnerella vaginalis* y otros microorganismos puede dar lugar a grandes avances en la comprensión de la fisiopatología de esta infección viral.

En cuanto a los factores de riesgos evaluados y su relación con la vaginosis bacteriana y la presencia viral es importante destacar en este estudio la multiparidad, aún cuando habría que esperar los resultados totales de la investigación para analizar un número más representativos de la población de estudio.

La sobreexpresión de la p16 ha demostrado ser de gran utilidad en la distinción entre procesos reactivos, displásicos y carcinomas *in situ*. Habrá que esperar los resultados finales para inferir en la conclusión precisa de la utilidad de marcador.

El diagnóstico de las lesiones neoplásicas del cérvix debe basarse en el estudio minucioso de los análisis microbiológicos, citológicos, histológicos y moleculares.

El cáncer cervical es la mayor causa de mortalidad en mujeres en todo el mundo. Estas infecciones de tipo oncogénico como los papilomavirus humanos (VPH) se asocian altamente con el desarrollo de cáncer cervical invasivo y precursora de lesiones, Aunque las infecciones por VPH son ampliamente prevalentes, únicamente unas pocas infecciones en mujeres pueden desarrollarse y llegar a cáncer cervical.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. p16INK4a/INK4a 2003.Expression Correlates with Degree of Cervical Neoplasia: A Comparison with ki-67 Expression and Detection of High-Risk HPV Types. *Mod Pathol*; 16: 665-73.
2. AL-Saleh W, Gianinni SL, Jacobs N, et al. Correlation of T-helper secretory differentiation and types of antigen-presenting cells in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *J Pathol* 1998;184: 283–290.
3. Apgar B, Brotzman G, Spitzer M. *Colposcopy. Principles and Practice. An Integrated Textbook and Atlas.* WB Saunders Co., 2002.
4. Bartlett JG, Onderdonk AB, Drude E, et al. Quantitative bacteriology of the vaginal flora. *J Infect Dis* 1977; 136:271-7.
5. Behbakht K, Friedman J, Heimler I, et al. Role of the vaginal microbiological ecosystem and cytokine profile in the promotion of cervical dysplasia: a case-control study. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2002;10:181–186.
6. Bibbo M, Klump W, Dececco J, Kovatich A. 2002. Procedure for immunocytochemical detection of p16INK4a antigen in Thin-Layer liquid-based specimens. *Act Cytol.*, 46 25-29.
7. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2003; 55: 244-65.
8. Bosch FX, Rohan T, Schneider A, Frazer I, Pfister H, Castellsague X, *et al.* Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. *J Clin Pathol* 2001; 54:163-75.
9. Boyle DCM, Smith JR. Infection and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 1999;9:177–186.
10. Caballero R, Batista R, Cué M, Ortega L, Rodríguez M., *Vaginosis bacteriana.* *RESUMED* 2000;13(2):63-75
11. Castellsagué X, Díaz M, De Sanjosé S, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S. Worldwide human Papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 303-15.

12. Castellsague X, Muñoz N. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis: role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31:20-8.
13. Colding H. *Gynecology: Clinical Update. Bacterial Vaginosis*. Kalamazoo, Mich: The Upjohn Company; 1990 Kimberlin DF, Andrews WW. Bacterial Vaginosis association with adverse pregnancy outcome. *Semin perinatal* 1998 Aug;22(4):242-50.
14. Consuegra C, Molina D, Egea E, Garavito G. El virus del papiloma humano (HPV), agente viral importante precursor de la mayoría de las displasias o cáncer cervical. *Salud Uninorte. Barranquilla (Col.)*, 19: 3-13, 2004.
15. Fitzhugh Valerie A., and Heller Debra S. Significance of a Diagnosis of Microorganisms on Pap Smear *MDJournal of Lower Genital Tract Disease*, Volume 12, Number 1, 2008.
16. Guijon F, Paraskevas M, Rand F. Vaginal microbial flora as a cofactor in the pathogenesis of uterine cervical intraepithelial neoplasia. *Inst Obstet Gynecol* 1992;37:185–191.
17. Hammill HA. Normal vaginal flora in relation to vaginitis. *Obstet Gynecol Clin North America* 1989;16:329-6.
18. Hay P, Taylor D, Lamont R. Diagnosis of bacterial vaginosis in a gynecology clinic. *Br J Obstet Gynecol*. 1992; 99: 63-99.
19. Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J, *et al*. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:464-74.
20. Kent. HL. Epidemiology of vaginitis. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 1168.
21. Kharsany AB, Hoosen AA, Moodley J, Bagaretee J, Gouws E. The association between sexually transmitted pathogens and cervical intraepithelial neoplasia in a developing community. *Genitourin Med* 1993;69:357–360.
22. Kinghorn GR. Genital warts: incidence of associated genital infections. *Br J Dermatol* 1978;99:405-9.
23. Klaes R, et al P16INK4a Immunohistochemistry Improves Interobserver Agreement in the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *The American Journal of Surgical Pathology* 26(11): 1389–1399, 2002.

24. Lacruz C, Di Martino B, Álvarez E. Incidencia de los diferentes tipos de papiloma virus humano (HPV) en las lesiones escamosas del cerviz uterino. REV ESP PATOL 2003; Vol 36, nº 1: 79-84.
25. Lewis, Merle J. Análisis de la situación del Cáncer Cervicouterino en América Latina y el Caribe. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C. OPS, 2004.
26. Márcia C.M. Guimarães, Maria Alice G. Gonçalves M, Christiane P. Soares, Jussara S.R. Bettini, Roberta A. Duarte and Edson G. Soares. 2005. Immunohistochemical Expression of p16INK4a and bcl-2 According to HPV Type and to the Progression of Cervical Squamous Intraepithelial Lesions Journal of Histochemistry and Cytochemistry. Volume 53 (4): 509-51.
27. Mardh PA. The vaginal ecosystem. Am J Obstet Gynecol 1991;165: 1163.
28. Melkert PW, Hopman E, Van Den Brule AJ, Risse EK, van Diest PJ, Bleker OP, *et al.* Prevalence of HPV in cytomorphologically normal cervical smears, as determined by the polymerase chain reaction, is age-dependent. Int J Cancer 1993; 53:919-23.
29. Moore DE, Spadoni LR, Foy HM, *et al.* Increased frequency of serum antibodies to Chlamydia trachomatis in infertility due to distal tubal disease. Lancet 1982;2(8298):574-7.
30. Muñoz N, Bosch FX, De San José S, Herrero O, Castellsague X, Shah KV, *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med 2003; 348: 518-27.
31. Nasiell K, Roger V, Nasiell M. Behavior of mild cervical dysplasia, during long-term follow-up. Obstet Gynecol 1986;67:665Y9.
32. Parazzini F, La Vecchia C, Negri E, *et al.* Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia. Cancer 1992;69:2276–2282.
33. Pavic N. Is there a local production of nitrosamines by the vaginal microflora in anaerobic vaginosis/trichomoniasis Med Hypotheses 1984;15:433–436.
34. Perez C, Paez B, Padilla J. Frecuencia de los tipos 16 y 18 del virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico en pacientes con diagnóstico histopatológico de condilomas de la Clínica Maternidad Rafael Calvo. Universidad de San Buenaventura Facultad de Bacteriología Cartagena de indias d.t. y c. 2006.

35. Piot P, VanDyke E, Godts P. et al. The vaginal microbial flora in non-specific vaginitis. *Eur J Clin Microbiol* 1982;1:301-6.
36. Platz C, Mattsby I, Thomsen P et al. Endotoxin and interleukin 1 in the cervical mucus and vaginal fluid of pregnant women with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 1161 -1166.
37. Platz C, Sundstron E, Larsson PG. Bacterial Vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1994;73:586 588.
38. Priestley CJ, Kinghorn GR. Bacterial vaginosis. *Br J Clin Pract* 1996 Sep; 50(6):331-4. 16. schering, programa de actualización continua para ginecología y obstetricia, enfermedades sexualmente transmitidas. 1998.
39. Sanjosé S, Alnirall R, Lloveras B, et al. Cervical human papillomavirus infections in the female population in Barcelona, Spain. *Sex Transm Dis* 2003; 30: 788-793. 13. Anh PTH, Hieu NT, Herrero R

40. Sano T, Masuda N, Oyama T, Nakajima T. 2002. Overexpression of p16 and p14ARF is associated with human papillomavirus infection in cervical squamous cell carcinoma and dysplasia. *Pathol Int.* May-Jun;52(5-6):375-83.
41. Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, et al. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2003;95: 1336Y43.
42. Shapova E, Borisov Y. The bacterial Vaginosis problem II. The microbiology of bacterial vaginosis. *Akush Ginekol* 1996;15(3):37-9.
43. Sierra Torres Carlos H., Acosta Aragón Maria P. y Orejuela Aristizabal Leonora *Papilomavirus* y Factores asociados a Neoplasia Intraepitelial Cervical de Alto Grado en Cauca, Colombia. *Rev. salud pública. Sup. 8 (1): 47-58, 2006*
44. Sobel JD. Candidal vulvovaginitis. *Clin Obstet Gynecol* 1993;36:153-65.
45. Strand AE, Rylander E, Evander M, Wadell G. Genital human papillomavirus infection among patients attending an STC clinic. *Genitourin Med* 1993;69:446-9
46. Tamayo L., Valencia M., Escobar S., Pérez L., Villa M., Bedoya A. Tendencia de la infección por el Virus Papiloma Humano (VPH) en usuarias del Servicio de Citología del Laboratorio Docente Asistencial de la Escuela

- de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad de Antioquia. Revista de la Facultad de Farmacia Vol. 42, 2006.
47. Thomason JL, Gelbart SM, Broekhuizen FF. Advances in the understanding of bacterial vaginosis. *J Reprod Med.* 1989; 34:584.
 48. Thomason J, Thomas L, Shroyer K. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Human Pathology* (2008) 39, 154–166.
 49. Tokyol C, Aktepe OC, Cevrioglu AS, Altindis M, Dilek FU. Bacterial vaginosis: comparison of Pap smear and microbiological test results. *Mod Pathol* 2004;17:857Y60..
 50. Trunk M, Dallenbach-Hellweg G, Ridder R, Ulrich K, Ikenberg H, Schneiderv, Von Knebel Doeberitz M. 2004b. Morphologic characteristics of p16INK4a-positive cells in cervical cytology samples. *Act Cytol.*, 48:771-782.
 51. Vardar E, Maral I, Inal M, Ozguder O, Tasli F, Postaci H. Comparison of Gram stain and Pap smear procedures in the diagnosis of bacterial vaginosis. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2002;10:203Y7.
 52. Voog E, Bolmstedt A, Olofsson S, Ryd W, Lowhagen G-B. Human papillomavirus infection among women attending an STD clinic correlated to reason for attending, presence of clinical signs, concomitant infections and abnormal cytology. *Acta Derm Venereol* 1995;75:75-8.
 53. Watts H, Fazarri M, Minkoff H, Hillier S, Sha B, Glesby M, Levine, Robert A, Palefsky J, Moxley M, Ahdieh L, Strickler H. Effects of Bacterial Vaginosis and Other Genital Infections on the Natural History of Human Papillomavirus Infection in HIV-1 Infected and High-Risk HIV-1 Uninfected Women. *Genital Infections and HPV JID* 2005:191 1 April.
 54. Wiese W, Patel SR, Patel SC, Ohl CA, Estrada CA. Ameta-analysis of the Papanicolaou smear and wet mount for the diagnosis of vaginal trichomoniasis. *Am J Med* 2000;108: 301Y8.

CAPITULO 2. REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA LITERATURA ACERCA DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO.

Cristian Garrido & Luis Villegas.

RESUMEN

En los últimos años se ha estudiado la asociación entre algunos tipos de papilomavirus humano (VPH) y ciertas lesiones de cuello uterino, específicamente el cáncer de cérvix o sus precursores. Hasta el momento se han descrito más de 100 tipos diferentes de VPH, de los cuales aproximadamente 85 han sido aislados de la mucosa anogenital.

Los tipos anogenitales de PVH, virus de transmisión sexual, se han dividido en dos clases mediante estudios epidemiológicos dependiendo de su asociación con el cáncer de cuello de útero:

- Tipos de bajo riesgo oncogénico: incluyen los tipos 6, 11, 40, 42, 43,44, 54, 61, 70, 72, 81 y 89.
- Tipos de alto riesgo oncogénico: incluyen los tipos 16, 18, 31, 33,35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82. Según el estudio citado, los tipos 26, 53 y 66 están considerados como probablemente de alto riesgo.

Aunque la infección por un VPH de alto riesgo oncogénico es la principal causa de desarrollo de cáncer en el cuello uterino, la mayoría de las mujeres infectadas con este tipo de virus no desarrollan ni lesiones de alto grado, ni cáncer de cuello de cérvix; debido a que gracias a la citología y a la colposcopia se han detectado a tiempo y se han logrado extirpar estas lesiones premalignas, por procedimientos quirúrgicos (cauterización, histerectomía, legrado, etc.)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se está empleando para la detección de agentes infecciosos, esta permiten identificar un número pequeño de microorganismos con una altísima especificidad.

Para el diagnóstico de neoplasias intraepitelial cervical (NIC) han llevado a investigar marcadores objetivos para la identificación de células displásicas. La

p16INK4a es un producto del gen p16, que ha demostrado ser útil en distinguir células neoplásicas mediante Inmunohistoquímica, y el grado de la lesión neoplásica.

Palabras claves: VPH, PCR, NIC, citología, Colposcopia, p16INK4a.

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO:

Los papilomavirus constituyen un género dentro de la familia *papoviridae*. Son virus pequeños de 55 nm de diámetro con una estructura icosaédrica y una cápside compuesta por 72 capsómeros que encierran un genoma de ADN circular de doble cadena con una longitud aproximada de 8.000 pares de bases. Se trata de virus que inducen la formación de verrugas en una amplia serie de vertebrados incluyendo el ser humano. En la mayor parte de casos se trata de infecciones asintomáticas aunque en los últimos años se ha demostrado su capacidad oncogénica. El ciclo replicativo del papilomavirus se produce de forma coordinada con la diferenciación y división celular del epitelio escamoso. El inicio de la infección se produce en las células basales del epitelio escamoso a través de microerosiones que exponen dicha capa al virus. La producción de viriones maduros, sin embargo, no se produce hasta la capa exterior del epitelio estando ligada la multiplicación viral al patrón normal de queratinización y diferenciación celular.

FACTORES DE RIESGO PARA LA INFECCION.

El riesgo de contraer un VPH genital está influenciado por la actividad sexual, por lo que el Cáncer de Cuello uterino sigue un patrón típico de enfermedades transmitidas sexualmente.

- Promiscuidad Hay una fuerte asociación entre el número de parejas que han tenido tanto la mujer como su compañero a lo largo de su vida y la adquisición del VPH. (Burk, Ho, Beardsley 1996)
- Actividad sexual a temprana edad.
- Tener historial de otras enfermedades transmitidas sexualmente.
- Verrugas genitales, test de papanicolaou con resultados anormales.

- Pareja sexual con cáncer de cérvix o de pene.
- Edad. La infección es más común en mujeres jóvenes sexualmente activas, de 18 a 30 años de edad, después de los 30 años decrece la prevalencia. El Cáncer de Cuello es más común después de los 35 años, lo que sugiere infección a temprana edad y progresión lenta a cáncer (Berkova, Daxnerova, 2000).
- Persistencia viral. Común entre los tipos virales de alto riesgo y factor determinante en el desarrollo a cáncer. La persistencia puede inducir cambios genéticos secundarios dado que las proteínas virales interfieren con los puntos de control del ciclo celular e inducen inmortalización de los queratinocitos.
- Uso prolongado de anticonceptivos orales. La región larga de control, LCR por las siglas en inglés, en el genoma viral, contiene elementos de respuesta a glucocorticoides, inducibles por hormonas como la progesterona (componente activo de los anticonceptivos orales) y la dexametasona. Estudios han reportado el uso de anticonceptivos orales y la alta positividad al DNA viral.
- Coinfección con otros virus, como el del herpes simple (HSV) tipo 2, citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano tipos 6 y 7(HHV-6), detectados todos en el cérvix.
- Carga viral. Correlaciona directamente con la severidad de la enfermedad. El VPH 16 puede alcanzar una carga viral más alta que otros tipos virales.
- Predisposición genética. Representa el 27% del efecto de los factores subyacentes para el desarrollo del tumor. La herencia afecta la susceptibilidad a la infección por VPH, la capacidad para resolverla y el tiempo de desarrollo de la enfermedad (Magnusson, Lichtenstein, Gyllenstein, 2000).
- Variantes virales intratipo.
- Vaginosis Bacteriana.

ESTRUCTURA DEL VIRUS

La cápside del virión consta de dos proteínas, una mayor con un peso molecular de 55 Kd que constituye el 80% del virus y una proteína menor de 70 Kd. El genoma de todos los VPH consiste en una cadena circular doble de ADN de 8.000 pares de bases. La transcripción del ADN se efectúa en una sola dirección siguiendo el sentido de las agujas del reloj. Los genes residen exclusivamente en una de las dos cadenas del ADN y se constituyen en ORF (*open reading frames*) o secuencias de lectura abierta. Funcionalmente están organizados en 3 regiones:

Genes tempranos (E): E1-E8 que codifican proteínas que funcionan como genes replicadores y reguladores y que se transcriben al inicio del ciclo vital del virus.

Genes tardíos (L): son L1 y L2 que codifican las proteínas de la cápside y que se expresan al final del ciclo vital del virus.

Genes reguladores (LCR): es la región larga de control que se encuentra entre las dos regiones descritas y contiene muchos de los elementos de control de la transcripción y regulación, es una región no codificante.

Los papilomavirus pueden afectar especialmente a los vertebrados superiores y poseen un alto grado de especificidad de especie para el huésped. (Xercavins, A. Gil, C. Centeno, 2002)

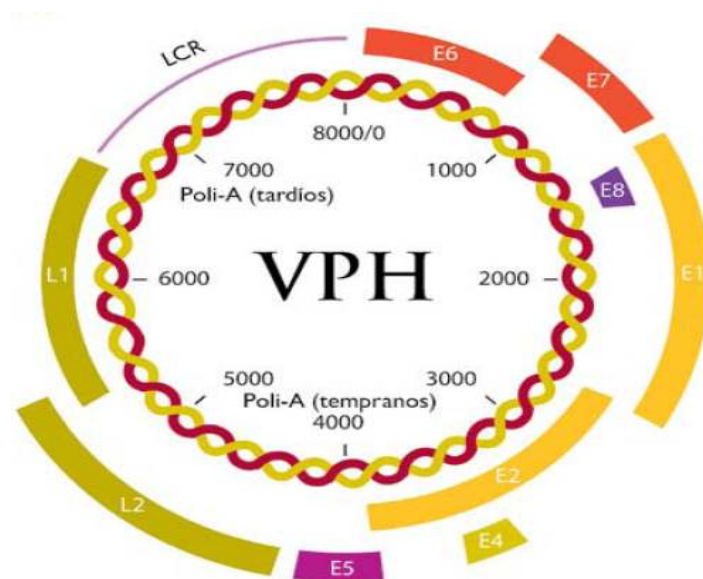


Fig 1: Organización del Genoma del PVH y los ORFs (E1 – E8, L1 – L2) y la Región Larga de Control (LCR)

Tomado de The Health professional HPV HANDBOOK: Human Papillomavirus and cervical cancer: 2004. The European Consortium for cervical Cancer education. Taylor & Francis Group

Los papilomavirus humanos, al igual que otros virus, aprovechan la maquinaria celular para replicarse; son epiteliotróficos y una vez alcanzan las células basales pueden permanecer en forma episomal, en estado latente, o bien abandonar esa latencia y aprovechar la diferenciación celular propia del epitelio cervical. De este modo, paralelamente a la maduración del epitelio cervical, los VPHs expresan sus genes de forma secuencial; en primer lugar los genes tempranos (E1-E8), en las capas basales y posteriormente, en capas superficiales del epitelio más diferenciado, expresan sus proteínas tardías (L1 y L2) que forman la cápside y permiten el ensamblaje de nuevas partículas virales que repetirán el ciclo. En determinadas circunstancias fisiológicas de “permisividad inmunológica” y tras un período de persistencia de la infección, generalmente largo, las partículas de ADN viral que se encuentran en forma episomal, sufren un proceso de integración dentro del genoma celular y con ello una serie de acontecimientos que conducen a un proceso de bloqueo de proteínas con funciones importantes en el ciclo celular (p53 y Rb) (Alba *et al.*, 2002).

Tabla 6: Tamaño y función de proteínas de Papilomavirus

Proteína Viral Elemento	Peso Molecular	Función
Genómico		
Elementos No Codificados		
Larga Región Control regulación de (LCR) PVH.	500 – 1000 pb	Origen de Replicación y la expresión de los genes del
Proteínas Tempranas		
E1	8 – 85 kDa	Función Helicasa esencial para la replicación viral y control de la los genes de Transcripción.
E2	48 kDa	Factor de Transcripción viral esencial para la Rep viral y control de los genes de transcripción; segregación del genoma y encapsidación
E3	Desconocida	No conocida; presente únicamente en pocos PVH.
E1 – E4	10 – 44 kDa	Une a las proteínas del del citoesqueleto.
E5	14 kDa	Interacciona con receptores EGF/PDGF.
E6	16 – 18 kDa	Degrada la p53 y activa la Telomerasa.
E7	~ 10 kDa	Proteína Transformadora se une e inactiva pRB.
E8 – E2	20 kDa	Proteína represora de la Replicación.

Proteínas Tardías

L1	57 kDa	Proteína de cápside Principal
L2	43 – 53 kDa	Proteína de cápside Secundaria.

Tomado: *The Aetiology of Cervical Cancer, NHSCSP Publication No 22 2005. Barcelona, España.*

REPLICACIÓN VIRAL ONCOGÉNESIS.

Una vez se ha producido la infección a nivel de la capa profunda del epitelio, el HPV se establece en forma de episomas ADN no integrado con algunas decenas de copias de genoma viral por célula que se replicarán coordinadamente con las células basales. En las lesiones cutáneas benignas el virus esta presente en forma de plásmido en situación extracromosómica en el núcleo de las células y se replica por separado por vía extracromosómica (Beutner, 2002). A medida que las células emigran hacia los estratos superficiales y se diferencian, cesa la replicación pero el genoma viral en algunos tipos de infección por VPH, se amplifica en las células escamosas superficiales hasta llegar a varios miles de copias por célula. En ese momento se pueden activar los genes tardíos (L1, L2) y se produce la proteína de la cápside, con lo que aparecen viriones completos. Las células superficiales en las que se acumulan numerosos viriones completos muestran características peculiares recibiendo el nombre de coilocitos. Las lesiones cervicales de bajo grado (CIN 1 o SIL de bajo grado) son el ejemplo de esta infección denominada infección productiva, produciéndose viriones completos. El patrón de diferenciación es similar al patrón de diferenciación del epitelio normal observando coilocitos en las capas superficiales pudiendo detectar antígenos de la cápside. (Xercavins, A. Gil, C. Centeno, 2002)

En las lesiones preinvasoras (SIL de alto grado, CIN III-carcinoma *in situ*) y en el carcinoma cervical, el ADN viral se encuentra integrado en el cromosoma de la célula hospedadora. Para ello es necesario que se rompa el genoma vírico que se fragmenta en la región E1-E2. El epitelio afectado está constituido por

células inmaduras de tipo basal y la ausencia de maduración reduce la replicación del virus, por lo que solamente hallamos algunas copias del mismo, no se produce en este caso la activación de los genes L1 y L2 y no se producen cápsides ni viriones completos. Como consecuencia de la rotura desaparece la función de E1-E2 que regula a E6 y E7 con la consiguiente transformación celular, ya que dichos genes codifican proteínas con función estimulante del crecimiento celular y serían los responsables de la carcinogenicidad del virus. El gen E6 se liga a p53 que es una proteína supresora de tumores, determinando la transformación maligna y la desaparición del crecimiento celular regulado. (Beutner, 2002). La proteína E7 induce desestabilización del complejo proteico del retinoblastoma y así permite a la célula evadir el control del ciclo mediado por pRb (Munger K, Basile JR, Duensing S, *et al*; 2001) y finalmente ambos genes inducen un desorden sustancial de las funciones mitóticas, interfiriendo la síntesis y su funcionamiento, generando un degradación de los cromosomas durante la mitosis y generando aberraciones tanto estructurales como numéricas. (Duesing S, Munger K. 2004).

La región Grande de control (LCR) es un segmento genómico, que no contiene marco de lectura alguno y que sí tiene numerosos elementos de respuesta según el tipo viral, extendiéndose de un 7 a 11% del genoma y de casi 850 pb en el caso de los VPH genitales. Algo muy importante es que su secuencia nucleotídica es extremadamente variable entre los diferentes tipos virales. Sin embargo, la LCR conserva elementos de regulación comunes a todos ellos. Funcionalmente se encuentra dividida en dos dominios principales: el RE2, regulado por la presencia de la proteína viral E2 y donde se localiza tanto el origen de replicación del ADN viral como el promotor temprano; y el dominio CE (celular enhancer), un fuerte potenciador de la transcripción cuya activación depende de factores transcripcionales celulares exclusivamente.

En el dominio RE2 se encuentra el promotor temprano, a partir del cual se transcriben los oncogenes E6 y E7. Posee una caja TATA funcional (a la cual se unen los factores necesarios e indispensables para iniciar la transcripción mediada por la ARN polimerasa II) y sitios de interacción de la proteína viral

E2, además de sitios de unión para el factor celular SP1 (proteína estimulante de la transcripción). En este dominio se ha descrito el origen de replicación del ADN viral, dependiente de las proteínas virales E1 y E2. La especificidad tisular de los HPV reside en el CE, donde la participación conjunta de factores celulares promueve la activación del promotor temprano exclusivamente en células de origen epitelial. Esta región CE se compone de numerosos sitios de asociación específica de diversos factores de transcripción de origen celular, como por ejemplo: AP – 1, entre otros. Además se ha descrito la presencia de un elemento de respuesta a glucocorticoides (ERG), el cual promueve la transcripción de HPV por un estímulo hormonal. (Consuegra, et al 2004)

LA REGIÓN LARGA DE CONTROL, LCR

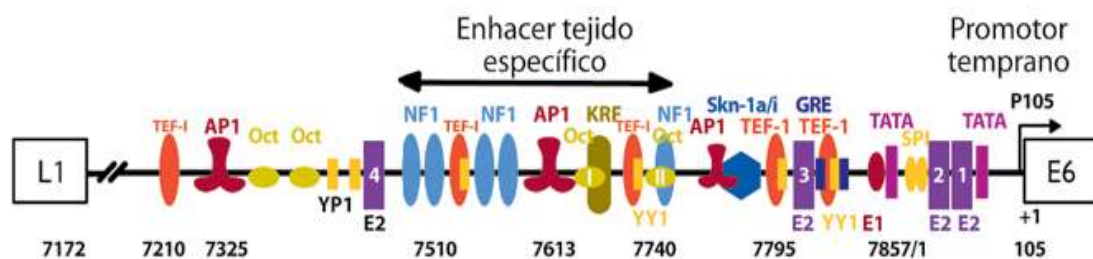


Fig 2: Tomado de <http://www.123bio.net/revues/ibouallaga/index.html>

La proteína viral E2 juega un papel central en la regulación genética de los HPV, reprimiendo o activando la transcripción, dependiendo de su cercanía entre sus sitios de interacción y la caja TATA. En HPV genitales existen dos sitios E2 (ACCGN – 4 + CGGT) a 3 - 4 pb de la caja TATA; esta configuración resulta en la represión del promotor temprano debido posiblemente a la exclusión física de los factores asociados a la caja TATA. Esta proteína viral (E2) posee tres dominios funcionales: el extremo aminoterminal, donde reside la actividad potenciadora de la transcripción que es, aparentemente, independiente de la interacción con el ADN; el extremo carboxilo terminal, donde se realiza la función de interacción con el ADN y, por lo tanto, es donde reside la capacidad de represión transcripcional; y la porción intermedia que, por su alto contenido de prolina, es considerada como una bisagra. La capacidad de activación de E2 se debe a la facilidad del extremo amino de interactuar físicamente con factores celulares. La actividad represora de E2

tiene interesantes implicaciones clínicas. En lesiones tumorales se ha demostrado la presencia de ADN genómico de HPV integrado al genoma celular. Esta integración interrumpe o rompe al gen E2, y de esta forma no se produce la proteína. Por lo tanto, los genes E6 y E7 de HPV no son regulados negativamente por E2. Por su parte, en lesiones benignas o premalignas, el ADN genómico del HPV se encuentra de forma circular (episomal, no integrada) y la expresión de E6 y E7 se daría de una forma regulada. Así, a la presencia de un tipo determinado de HPV como un factor de riesgo para el desarrollo de una neoplasia, se suma la integridad del gen E2 como un factor para progresión viral.

La transcripción de los HPV se lleva a cabo exclusivamente en células de origen epitelial, debido a la presencia de factores celulares tejido - específicos. El factor AP - 1 tiene afinidad por la secuencia 5'- TGAG/CTC/AC - 3', la cual se presenta en un par de ocasiones en la LCR de HPV genitales y cuya integridad resulta de gran importancia para la transcripción temprana de HPV. AP - 1 está constituido por los productos de las familias de oncogenes celulares *jun* y *fos*, los cuales constituyen homo o heterodímeros funcionales capaces de activar fuertemente la transcripción y confieren una alta y rápida respuesta por la vía del diacilglicerol. Las combinaciones de los diferentes productos de la familia *jun* entre sí y con los de la familia *fos* parecen establecer la transcripción tejido específica.

Existe otra familia de reguladores transcripcionales que conducen a la transcripción tejido - específica como NF -1/CTF. Existen múltiples sitios para NF -1/CTF en la LCR de los HPV genitales. Se ha demostrado que la interacción de este factor tiene importancia para la expresión dependiente de epitelios; sin embargo, los tipos particulares de NF -1/CTF involucrados en esta activación son aún desconocidos.

La estimulación de la transcripción de HPV genitales por hormonas esteroides llevó al descubrimiento de un elemento de respuesta a glucocorticoides (ERG) dentro de la LCR. El ERG por sí solo es capaz de activar la transcripción del promotor temprano de HPV genitales y establece una correlación con la observación clínica de papilomatosis asociada al embarazo. La presencia de

sitios de interacción para el factor octa -1 fue detectada originalmente en la LCR del HPV tipo 18 octa -1 pertenece a una familia de factores transcripcionales relacionados con la presencia de un dominio común (dominio POU), los cuales regulan la actividad transcripcional durante el desarrollo. La interacción octa -1 con otros tipos de HPV genitales ha sido observada, aunque la participación de este factor como un represor de la transcripción temprana fue descrita para el HPV tipo 18.

Se ha observado, además, una secuencia conservada en los HPV tipo 16 y 18 (asociados a carcinomas cervicales). En esta secuencia interactúan factores transcripcionales conocidos como TEF -1 y TEF -2 son considerados como factores transcripcionales epitelio específicos para HPV 16. Es importante tener en cuenta que la transcripción epitelio específica de los HPV genitales depende de una gran variedad de factores celulares transcripcionales, muchos de ellos considerados parte de familias multigénicas responsables de la transcripción celular y tejido específico (Álvarez, et al 2006).

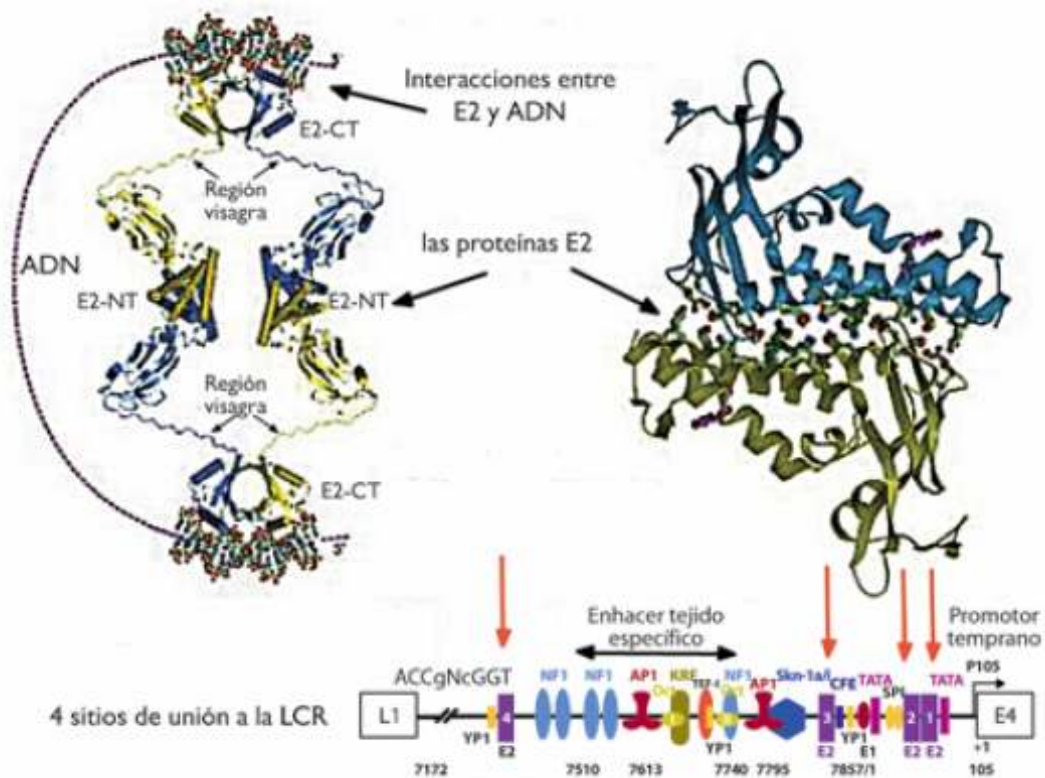


Fig 3: Tomado de [http://search.yahoo.com/search/images?p=papilomavirus&ei=UTF-8&fr=FP-tab-img-t&b=21\(modificado\)](http://search.yahoo.com/search/images?p=papilomavirus&ei=UTF-8&fr=FP-tab-img-t&b=21(modificado))

PROTEÍNAS L1 Y L2

La proteína L2, de 43 a 53 kDa, es la minoritaria de la cápside viral, que como L1, se produce en células que expresan E4. La proteína mayoritaria L1, de 57 kDa y que conforma cerca del 80 % de la cápside, se expresa después de L2. La cápside contiene 360 copias de L1 y aproximadamente 12 copias de L2, organizados en 72 capsómeros de una partícula icosaedral. La proteína L2 se acumula en estructuras nucleares conocidas como dominios oncogénicos de la proteína de leucemia promonocítica (PML) durante el ensamble del virus y atrae a L1 hacia estos dominios. Se ha sugerido que estos cuerpos PML son el sitio de la replicación del DNA viral y que las proteínas de la cápside se acumulan en este sitio para facilitar el empaquetamiento. Apparently las proteínas L1 y L2 de VPH no participan en la inducción de lesiones. En la actualidad se están considerando tanto las partículas virales vacías como las proteínas estructurales aisladas (L1/L2) para una vacunación profiláctica. Hasta la fecha se ha demostrado que partículas sintéticas (L1/L2) pueden ser obtenidas en sistemas de vectores recombinantes. (López, Lizano, 2002; Day, Roden, Lowy, 1998)

EL CICLO VIRAL: INFECCIÓN Y DESENSAMBLE DEL VIRIÓN

Las partículas infecciosas entran a las células basales o germinales a través de una abertura en el epitelio estratificado. Tal abertura puede ocurrir en condiciones donde la piel tenga alguna lesión. Para los VPH de alto riesgo como VPH 16, la formación de lesiones cervicales se facilita por la infección de células columnares que después formarán la capa basal del epitelio estratificado de la zona de transformación. No se ha identificado un receptor de membrana definido para la entrada del virus, aunque el complejo integrina $\alpha 6 - \beta 4$ se ha propuesto como candidato. Además se ha visto que la entrada depende de la presencia de los proteoglicanos de sulfato de heparina presentes en la membrana plasmática, que podrían ser el lugar de unión inicial previo a la unión con el receptor (Giroglou, *et al*, 2001; Evander, Frazer, Payne, 1997)

La internalización del virus ocurre por endocitosis de vesículas cubiertas de clatrina. El desensamble del virión puede ser a través del rompimiento de

enlaces disulfuro internos de la cápside, dado el ambiente reductor de la célula, lo que permitiría el transporte del DNA viral al núcleo de esta. (Day, Lowy, Schiller, 2003; Li, Beard, Estes, 1998)

MANTENIMIENTO DEL GENOMA

Después de la infección y desensamble en las células basales y para mantener su genoma episomal en bajo número de copias, 10 a 200 por célula, se expresan las proteínas E1 y E2 (Wilson, West, Woytek, 2002), que además facilitan la segregación correcta de los genomas durante la división celular. En VPH 31, en líneas celulares epiteliales, se ha visto que si hay una falla para expresar E1, se pierde el estado episomal y el genoma viral se integra al de la célula. La infección inicial es seguida por una fase proliferativa que conduce al incremento del número de células basales que contienen el genoma viral, lo que puede requerir la expresión de las proteínas E6 y E7 que estimulan el progreso de la fase de ciclo celular G1 a S. (Frattoni MG, Lim HB, Laimins LA, 1996)

FASE PROLIFERATIVA

La expresión de E6 y E7, de un ARNm bicistrónico bajo el control del promotor temprano en la LCR, evita que la célula basal interrumpa el ciclo celular una vez que esta migra al estrato suprabasal del epitelio. Estas proteínas retardan la diferenciación celular y promueven la proliferación mediante interacciones con proteínas celulares responsables el control del ciclo celular. (Sherman L, Jackman A, Itzhaki H, 1997).

AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA Y SÍNTESIS DE LOS VIRIONES

Para que se produzcan viriones infecciosos, los VP deben amplificar su genoma y empaquetarlo en la partícula proteica. Esto ocurre en las capas superiores del epitelio, en el estrato espinoso, donde aumenta la actividad transcripcional del promotor tardío dependiente de la diferenciación. Este promotor se halla en el marco de lectura del gen E7 y promueve la

transcripción de proteínas involucradas en la replicación del DNA viral, tales como E1, E2, E4 y E5, así como las constituyentes de la cápside, L1 y L2. Para la replicación viral se necesita que E2 se una a la LCR y que promueva la unión de E1 en el sitio de origen de la replicación viral. El ensamble de las partículas virales ocurre en el estrato granuloso del epitelio y eventualmente las células infectadas se descaman de la capa superior de este. El virus es estable extracelularmente ya que es resistente a la desecación y puede ser transmitido directamente a otros individuos. Alternativamente las células infectadas permanecen en el ambiente antes de que el virus sea transmitido a una nueva superficie epitelial, como ocurre en virus que infectan superficies cutáneas. El VP no es lítico y se ha sugerido que la proteína E4 contribuye al egreso del virus de las capas superiores del epitelio mediante el rompimiento de los complejos de citoqueratina (Figura 5) (Doorbar J, Ely S, Sterling J, 1991)

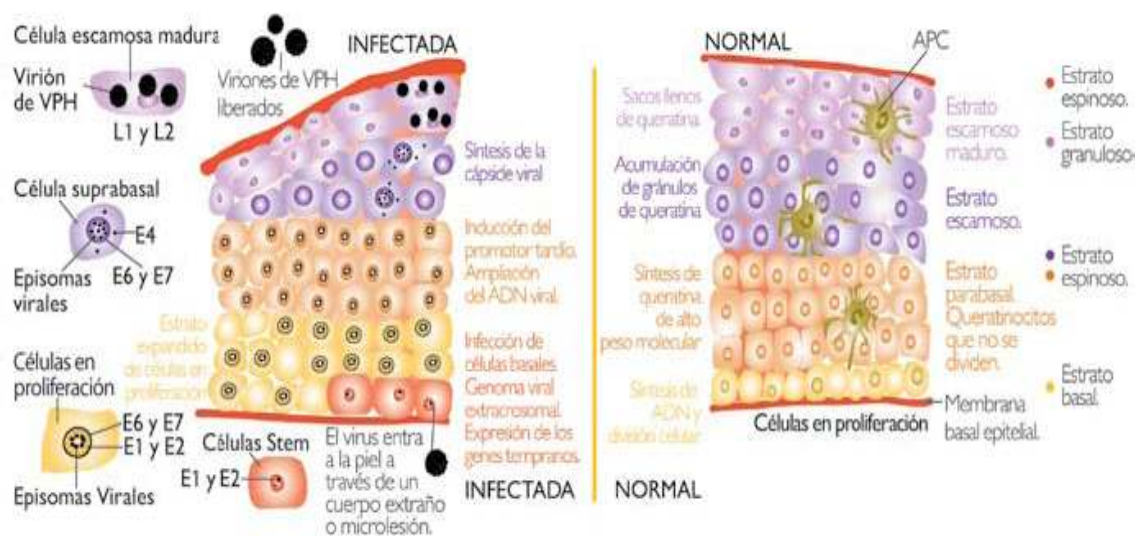


Fig 4: Tomado de Ian H Frazer (2004): Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. Nature Review Immunology

PATOGÉNESIS.

El virus inicialmente se presenta como un elemento extracromosómico autoreplicativo que se denomina episoma. En esta fase, la replicación del virus se hace sincrónicamente con la división de la célula del huésped, por lo que el número de las copias virales no se disminuye con el tiempo. La fase de incubación dura aproximadamente 6 semanas a 8 meses, período en el cual grandes zonas del epitelio genital y anal son colonizadas sin que ocurra

manifestaciones clínicas ni histológicas; en este momento la infección es conocida como latente (replicación episomal viral). Esta infección puede progresar a una expresión activa (replicación viral productiva o vegetativa), con el efecto citopático viral concomitante, lo que representa la pérdida del control celular local; para esto se requiere la interacción con la célula huésped y su permiso, en interacción con el estado inmune del huésped y factores de riesgo, tales como infección por otros virus, comienzo de relaciones sexuales a temprana edad, uso de nicotina, tipo de HLA y genotipo del HPV. (Consuegra, Molina, Egea, Garavito, 2004)

La inserción del genoma de HPV al genoma celular rompe una parte del gen E2, desde el cual sólo se transcribe el dominio activador de la transcripción desregulada de E6 y E7 este ADN integrado se replica durante cada mitosis celular, de tal modo que un contenido cromático aneuploide se desarrolla en la célula huésped y le da morfología displásica; en estos casos, la producción de ADN viral es mucho menor en infecciones vegetativas y los productos de genes tardíos casi nunca aparecen. (Sánchez, Valencia, 2001)

INCIDENCIA Y PREVALENCIA

La incidencia y prevalencia del cáncer cervical, presentan gran variabilidad según la zona geográfica estudiada, siendo este el segundo cáncer más frecuente entre las mujeres a nivel mundial. En Colombia es la primera causa de morbilidad por cáncer ginecológico y la segunda de mortalidad de la mujer en edad reproductiva (Medina *et al.*, 1994; Parkin *et al.*, 2001, Redondo *et al.*, 2004).

El impacto del cáncer cervicouterino en el mundo es devastador, siendo la segunda causa de muerte en la mujer y la primera causa en naciones en vías de desarrollo. El virus del papiloma humano se ha encontrado en el 93% de todos los casos de cáncer invasor y de sus lesiones precursoras, por lo que se considera a la infección por este virus como el factor de riesgo más importante. (Castellanos, 2003)

La infección por VPH se considera una enfermedad de transmisión sexual y hoy por hoy se considera el factor causal más importante en el 99,7% de los cánceres del cuello uterino. En países en vías de desarrollo el cáncer del cérvix es la segunda causa de muerte por cáncer; en nuestro país es la primera causa, se considera un grave problema de salud pública, por tanto enfocaremos el desarrollo del tema en la relación que hay entre VPH y cáncer de cuello uterino. (Di Giampietro, 2004)

América Latina y el Caribe tienen algunas de las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer cervicouterino más altas del mundo, sólo superada por las de África Oriental. Durante los 40 últimos años, las reducciones en la incidencia de cáncer cervicouterino han dado lugar a tasas significativamente bajas, inferiores a 10 casos por cada 100.000 mujeres, en Canadá, Estados Unidos. Sin embargo, en la mayoría de los países de América Latina, las tasas anuales de cáncer cervicouterino se mantienen altas, generalmente por arriba de 20 casos por cada 100.000 mujeres. En América latina, la supervivencia de las mujeres con cáncer cervicouterino es más corta porque a menudo solicitan atención cuando la enfermedad ya está avanzada. La baja supervivencia también se relaciona con una atención paliativa inadecuada y un tratamiento incompleto. La incidencia y mortalidad del cáncer cervicouterino se relacionan con la pobreza, el acceso limitado a los servicios, la vida en zonas rurales y los bajos niveles de educación. (Lewis, 2004).

Los países en vías de desarrollo tienen incidencias más altas de cáncer cervicouterino que los países desarrollados. Esta diferencia puede deberse a que estos últimos tienen acceso a mejores sistemas de salud pública. Sin embargo otra posibilidad es que las poblaciones están expuestas a cepas o variantes virales con diferentes propiedades patogénicas. (Calleja-Macias., *et al* 2004).

En un futuro próximo, se proyecta que la incidencia y la mortalidad del cáncer cervicouterino aumenten, conforme una mayor esperanza de vida desemboque en un número creciente de mujeres mayores. En América Latina y el Caribe, se calcula que las muertes aumentarán a 42.000 y 52.000 para los años 2010 y

2020, respectivamente, aunque las proyecciones más pesimistas indican que, para 2020, el número de defunciones podría llegar a 57.000.

TAXONOMÍA

El virus del Papiloma se clasifica en 3 niveles taxonómicos: Género, Especie y Tipo. Los diferentes géneros comparten menos del 60% de identidad en la secuencia de L1; el gen L1 es el más conservado del genoma viral y por tanto ha sido usado para identificar nuevos tipos virales. Un nuevo tipo viral es reconocido como tal solo si la secuencia nucleotídica del gen L1 difiere por poco más del 10% de aquella del tipo viral conocido más cercano. Diferencias de 2 a 10% definen a un subtipo viral, mientras que la diferencia menor a 2% define a una variante viral. Las especies de un género comparten una identidad de secuencia de 60 a 70% y los tipos virales dentro de una especie comparten de 71 a 89% de identidad de secuencia. Los Virus del papiloma conocidos que infectan tanto a humanos como a animales forman 16 géneros que se identifican por letras griegas. Cinco de estos géneros se componen exclusivamente de VPH's y VP's identificados en algunos primates, todos los otros géneros contienen tipos encontrados en varios mamíferos y aves. El género clínicamente más importante es el referido como los virus del papiloma-Alfa o VP-Alfa (en inglés Alpha-papillomavirus). Contiene a todos los tipos de VPH asociados a lesiones en mucosas o genitales. Los VP-Beta incluyen todos los tipos de VPH asociados con epidermodisplasia verruciformis (EV), una enfermedad neoplásica cutánea con componente genético. En aquellos portadores que no son genéticamente predispuestos a la enfermedad, los VP-Beta y los VP-Gama establecen infecciones asintomáticas, o en el peor de los casos producen pequeñas lesiones cutáneas neoplásicas benignas. Algunos de los virus de estos dos géneros también se han hallado asociados a cáncer de piel en individuos inmunosuprimidos. (Hans-Ulrich B, 2005)

REGRESION Y PERSISTENCIA.

La mayoría de las lesiones leves o moderadas revierten espontáneamente en individuos inmunocompetentes (Holowaty P. et al, 1999). Se sabe que más del 70% de las adolescentes sexualmente activas y mujeres jóvenes adquieren

una infección por VPH. Sin embargo, la mayoría son transitorias y solo cerca del 25% desarrollan una lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL por las siglas en inglés bajo el sistema Bethesda de clasificación de células displásicas cervicales). Después, solo del 20 a 40% de estas LSIL progresará a lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL). Esto significa que aquellas mujeres que en alguna ocasión adquieren un VPH, solo el 5 o 10% de ellas desarrollarán una HSIL, mientras que cerca del 90% de las mujeres infectadas no mostrarán evidencia alguna del tipo viral adquirido después de 12 a 36 meses. (Holowaty P, 1999), Sin embargo, en aquellos con una deficiencia inmune, heredada o inducida farmacológicamente, hay una fuerte tendencia para que la infección persista y malignice en caso de infección con VPH de alto riesgo oncogénico. Si el virus permanece en forma latente, una mujer que parece haber tenido una regresión de su infección entre sus visitas de seguimiento estaría aún en riesgo de desarrollar alguna lesión asociada al VPH. Se ha encontrado que la infección con múltiples tipos virales de VPH está asociada con persistencia (Muñoz N, Bosch FX, 2003). Los estudios de Bachtiry y Van Der Graaf sugieren que la infección múltiple está asociada con un mayor riesgo de progresión de la enfermedad. No está claro si esto es debido a la susceptibilidad del hospedero, la interacción entre los virus o la probabilidad de progresión independiente en cada tipo viral.

DIAGNOSTICO: CITOLOGICO, HISTOLOGICO, COLPOSCOPICO MOLECULAR E INMUNOHISTOQUIMICA

Ante el resultado de una citología anormal debe establecerse, siempre que sea posible, un diagnóstico de confirmación basado en un estudio histológico en el tejido en que se originan las células anormales. Para esta finalidad la colposcopia es la Técnica de elección, ya que es un método insustituible en el protocolo de diagnóstico y tratamiento de las lesiones intraepiteliales y del cáncer inicialmente invasivo del tracto genital inferior. El diagnóstico final, siempre debe integrar la información clínica y colposcópica junto con los resultados de laboratorio (citología, biopsia, detección del VPH, etc.) (Benedet, *et al* 2000)

La colposcopia: Es una técnica basada en la exploración magnificada de los epitelios del cuello uterino, la vagina y la vulva, cuyo objetivo fundamental es el diagnóstico de lesiones invasivas o precursoras del cáncer. La identificación de características sutiles inapreciables a simple vista que son la expresión de cambios patológicos, permite valorar el grado de anormalidad del tejido, así como la morfología y la topografía de las lesiones y localizar el área más sospechosa para obtener una biopsia.

La biopsia dirigida colposcópicamente permite confirmar el diagnóstico antes de efectuar el tratamiento definitivo y se considera el patrón estándar en el diagnóstico de dicha enfermedad. En las situaciones que no es posible visualizar la unión escamoso cilíndrica, la colposcopia debe considerarse insatisfactoria; en estos casos debe descartarse lesiones de localización endocervical. Con menor frecuencia las lesiones pueden asentarse en la vagina y/o la vulva, por lo que es imprescindible una cuidadosa revisión de todo el tracto genital inferior. El objetivo de la colposcopia es aumentar la sensibilidad de la citología. Se sabe desde hace mucho tiempo que el empleo conjunto de citología y colposcopia tiene un valor casi del 100% en determinar la presencia del virus detectando CIN 2-3 o carcinoma invasivo. (Puig *et al* 1988).

VACUNAS PROFILÁCTICAS FRENTE AL VPH

El desarrollo de las vacunas contra el VPH experimentó un gran avance a principios de los años 1990 cuando se descubrió la síntesis de las partículas semivirales, partículas similares al virus (virus like particles o VLPs) o partículas pseudovirales, mediante sistemas de expresión microbiana o celular, por ingeniería genética. Las VLP tipo L1 purificadas, una proteína estructural de los VPH, se utilizan como antígenos; estas proteínas son muy inmunógenas e inducen la síntesis de anticuerpos neutralizantes. Al mismo tiempo, al no contener material genético, no pueden causar infección en el huésped, por lo que no tienen capacidad oncogénica. Las principales características de las vacunas profilácticas se resumen en la Tabla 1. También están en investigación en fase II vacunas terapéuticas en mujeres ya infectadas,

compuestas por proteínas de fusión y péptidos. Vacuna monovalente tipo 16. Los primeros estudios con una vacuna profiláctica se realizaron con éxito con esta forma monovalente. La vacuna disminuyó la incidencia de la infección y de la neoplasia intraepitelial cervical relacionada con este virus. La vacuna fue muy bien tolerada, segura, y muy inmunógena. Esta vacuna no se comercializará. Otras dos vacunas profilácticas que están pendientes de comercialización en los próximos meses son una bivalente y otra tetravalente. (Koutsky et al 2006).

Vacuna bivalente 16/18. Vacuna compuesta por partículas VLP tipo L1 de la cápside de los tipos 16 y 18 (Cervarix, GlaxoSmithKline) para su uso en mujeres (10-55 años). Esta vacuna tiene un adyuvante AS04 que contiene 500 mcg de hidróxido de aluminio y 50 mcg de monofosforil lípido A 3-desacilado (MPL). El AS04 induce una respuesta inmunitaria potente y duradera; la concentración de anticuerpos obtenida es muy superior al de la infección natural. La vacuna fue eficaz en la prevención de las infecciones transitorias y persistentes del cuello uterino por los VPH 16 y 18 y de las lesiones citológicas asociadas a ellas. En la población de análisis por protocolo, la eficacia fue del 91,6% frente a la infección transitoria y del 100% en la infección persistente. La vacuna fue segura, bien tolerada y muy inmunógena. Además, se ha observado una ampliación de la protección, es decir, la aparición de una inmunidad cruzada, frente a la infección por los tipos 45, 31 y 52, que ocupan, en frecuencia, los lugares posteriores al 16 y al 18, entre los tipos oncogénicos. La vacuna tiene un buen perfil de seguridad a largo plazo. (Harper et al 2004).

TIPO VACUNA	LABORATORIO Nombre vacuna	GENOTIPOS	INDICACIÓN	POSOLOGÍA	VÍA
Monovalente	Merck & Co No comercializada	VLP 16	Ca de cérvix	0, 2, 6 meses	IM
Bivalente	GlaxoSmithKline Cervarix	VLP 16,18 Adyuvada con AS04: Al(OH) ₃ +MPL I. cruzada: 45, 31, 52	Ca de cérvix	0, 1, 6 meses	IM
Tetraivalente	Merck&Co Gardasil	VLP 6, 11,16,18, Adyuvada con fosfato de Al	Ca de cérvix Condilomas	0, 2, 6 meses	IM

Tabla 7: Características de las vacunas antipapilomavirus.

Tomado de F.A. Moraga Llop, Vacunacion Anti VPH: Situacion Actual y Desarrollo Clinico. 2006

Vacuna tetraivalente 6/11/16/18. Esta vacuna incorpora los tipos 6 y 11, los que producen condilomas o verrugas genitales, al 16 y al 18 (Gardasil, Merck & Co), para su uso en mujeres (9-26 años) y en hombres (9-15 años).

La incidencia combinada de infección persistente o enfermedad producida por los tipos 6, 11, 16 y 18 se redujo en un 90% (IC95%: 71-97) en las mujeres asignadas al grupo de la vacuna en comparación con el placebo, en la población de análisis por protocolo. La eficacia respecto a la enfermedad clínica asociada a los tipos vacunales fue del 100%. La vacuna fue inmunógena y bien tolerada (Villa et al 2006).

La pauta vacunal es de tres dosis por vía intramuscular, a los 0, 1 y 6 meses, y a los 0, 2 y 6 meses, para la bivalente y la tetraivalente, respectivamente. El precio de una pauta de tres dosis, aunque no ha sido confirmado por los laboratorios fabricantes. La vacuna frente al VPH se deberá incorporar en el calendario de la preadolescente, es decir, antes del inicio de la actividad sexual, y en las adolescentes y las mujeres jóvenes. La forma de implementación de la vacunación en los programas de inmunización será muy importante para lograr altas coberturas vacunales en las preadolescentes. En el país donde se quiera incluir la vacuna como sistemática se necesita conocer la incidencia de la infección por los tipos de vacunación, y hay que realizar estudios de eficiencia de las diferentes estrategias de vacunación (para

adolescentes y/o adultos, mujeres y/o hombres). La edad recomendada para la vacunación en la preadolescencia es de 11 a 12 años, con un rango de 10 a 13 años; hay que tener en cuenta que en EE.UU. el 28% de las adolescentes de 14 a 15 años son sexualmente activas. El efecto de la vacunación en la disminución del número de casos de cáncer de cérvix no se observará probablemente hasta diez años después de iniciado un programa; en cualquier caso, éste no puede reemplazar el uso sistemático del test de Papanicolaou (Schiller JT.) Vacunas de segunda generación en investigación. Se pretende que sean más baratas en su fabricación y distribución, que se puedan administrar en una sola dosis, que tengan una mayor cobertura de tipos de virus y que induzcan una regresión de la neoplasia ya establecida. Ambas vacunas, han demostrado un alto grado de aceptación y aplicabilidad, no describen efectos secundarios apreciables, locales o generales, que hayan provocado abandonos en proporción significativa en las mujeres vacunadas. El seguimiento de estas cohortes (4–5 años) ha permitido establecer que la inmunogenicidad provocada por la vacuna se sitúa muy por encima de la producida por la infección natural, con niveles estables por el momento, pero no es posible predecir hoy, con la información disponible, si será necesario administrar dosis de refuerzo. Estudios de proyección matemática, testados con otras vacunas ya comercializadas, sitúan la duración de la respuesta sobre los 15 años. (Kim, JJ, 2006).

Estas vacunas son estrictamente profilácticas: las mujeres VPH + pueden ser vacunadas, no siendo necesario cribado previo a la vacunación. Los datos disponibles describen que el curso de su presencia viral no está modificado por la vacuna, aunque se ha detectado, en estas mujeres, que la vacuna genera un incremento de su tasa de anticuerpos. (Koutsky LA, Harper DM. 2006).

La aceptabilidad inicial de la vacuna por padres y educadores, aunque desconocida, es previsible que se incremente mediante una adecuada y rigurosa información por parte de los medios (radio y TV), personal (entrevistas), y material divulgativo escrito a través de la prensa diaria y científica. El papel de los profesionales sanitarios en toda esta labor es básico y muy importante: todos los niveles de responsabilidad situados en la cercanía

de la población diana de la vacuna deben involucrarse en el proceso. Las Sociedades Científicas deben facilitar información actualizada y consensuada, promoviendo iniciativas de todo tipo, usando todos los medios disponibles. (Sherris J, et al 2006)

El objetivo a corto medio plazo de la vacuna es la prevención de las lesiones precursoras del cáncer de cuello de útero, neoplasia intraepitelial de cuello de útero, CIN, especialmente la considerada lesión precursora necesaria, CIN 3. Los registros que informan sobre tasas poblacionales muestran cifras del orden del 30 por cien mil mujeres. Además, una de las vacunas (la tetravalente) plantea la posibilidad a corto plazo de prevenir las verrugas/ condilomas genitales y la papilomatosis respiratoria recurrente (PRR), causadas por los tipos 6 y 11 del VPH. Se espera que el impacto apreciable a corto plazo provocado por la vacuna frente al VPH sea la gran disminución de resultados citológicos cervicales anómalos (RCA), que incluyen atipias inciertas y lesiones intraepiteliales de bajo grado, que traducen la respuesta aguda a la presencia viral, pasajera la mayoría de veces, y cuyo proceso de evaluación representa una carga elevada de ansiedad para la mujer, de trabajo para el profesional médico y de costes para el sistema sanitario (Franco E, et al.2006).

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Alba A, Cortes X, Bosch X, Torné A, Castellsagué X, Vidart J, Coll C, Vilaplana E. La infección por papilomavirus. Documentos de Consenso S.E.G.O. 2002.
- Alba A. Bioinmunología y marcadores de la CIN y del cáncer de cervix Instituto de Estudios Celulares y Moleculares. Galicia 2006.
- Álvarez L, Ácidos nucleicos terapéuticos contra cáncer cervical: una alternativa viable. Cinvestav octubre-diciembre 2006.

- Baak J, Kruse A, Robboy S, Janssen E , Van Diermen B, Skaland I, Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers. *J. Clinic. Pathology* 1017-1028.
- Benedet JL, Cabrero L. Strategies for the modification of risk factor in gynecological cancer. *Eur J Ginecol Oncol.* 2002; 23(1): 5-10.
- Berkova Z, Daxnerova Z, Icenogle J, Reeves WC, Kaufman RH. Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2000; 182(2):257-264.
- Beutner KR, Tyring S. Human Papillomavirus and human Disease. *The American Journal of Medicine.* 1997 Volume 102, may 5, pp 9 – 14
- Bosch X, Iftner T. The Aetiology of Cervical Cancer. NHSCSP Publication No 22 September 2005.
- Burk RD, Ho GY, Beardsley L: Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J. Infect. Dis.* 1996; 174(4): 679 – 89
- Calleja-Macias IE, Mina Kalantari AB, Huh J, Genomic diversity of human papillomavirus 16, 18, 31 and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African and Native American variants. *Virology* 2004 319. 315–323
- Canedo A, Alcántara A, Ortiz C, Expresión de p16INK4a en biopsias de cérvix uterino. Utilidad en el diagnóstico diferencial entre cervicitis crónica reactiva, neoplasia intraepitelial cervical de bajo y alto grado y carcinoma invasor. *Anales Medicos.* Vol. 51, Núm. 2 Abr. - Jun. 2006 pp. 49 – 57

- Cañadas MP, Lloveras B, Lorincz A, Ejarque M, Font R, Bosch FX, De Sanjosé S. Evaluación de las técnicas de detección del VPH en los programas de cribado para cáncer de cuello uterino. *Salud Publica Mex* 2006; 48:373-378.
- Castañeda M, El Cáncer Cervical como problema de salud publica en mujeres mexicanas y su relación con el virus del papiloma humano. Universidad Autónoma de Barcelona Departamento de pediatría, obstetricia y ginecología, 1999.
- Castellanos M, Cáncer cervicouterino y el VPH. Opciones de detección. Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. 2003
- Castellsagué X, Bosch FX. Avances en la prevención del cáncer de cuello de útero: vacunas VPH. *Farm Hosp* 2007; 31: 261-263.
- Clifford G. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the internacional Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled análisis. *Lancet*. 366. 2005.
- Consuegra C, Molina D, Egea E, Garavito G. El virus del papiloma humano (HPV), agente viral importante precursor de la mayoría de las displasias o cáncer cervical. *Salud Uninorte. Barranquilla (Col.)*, 19: 3-13, 2004.
- Daponte A, Pournaras S, Mademtzis I, Hadjichristodoulou C, Kostopoulou E, Maniatis A, Messinis I, Evaluation of HPV 16 PCR detection in self compared with clinician-collected samples in women referred for colposcopy. *Elseiver Gynecologic Oncology* 2006.
- Day PM, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology*. 2003 307: 1- 1

- Deluca G, Marin H, Schelover E, Chamorro E, Vicente I, Albhom M, Alonso J, infección por chlamydia trachomatis y papilomavirus en mujeres con alteraciones citohistológicas de cuello uterino. Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste 2006.
- Di Giampietro., VPH y Cáncer Ginecológico. Red de Sociedades Científicas. 2004.
- Doorbar J, Ely S, Sterling J, 1991: Specific interaction between HPV 16 E1 - E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*. 352: 824–7
- Duesing S, Munger K, Mecanism of genomic instability in human papillomavirus oncoprotein. *Int J Cancer* 2004. Mar 20, 109 (20): 157-62.
- Evander M, Frazer IH, Payne E, 1997: Identification of the alpha-6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol*, 71, 2449-2456
- Franco E, Cuzick J, Hildesheim A, De Sanjosé S. Issues in planning cervical cancer screening in the era of HPV vaccination. *Vaccine* 2006; 24 (Supl 3): S3/171-77.
- Frattini MG, Lim HB, Laimins LA, 1996: In vitro synthesis of oncogenic HPVs requires episomal genomes for differentiation-dependent late gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 93: 3062–7
- Frega A, Stentella P, De Ioris A, Piazzea J, Fambrini M, Marchionni M, Vinicio E. Young women, cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus: risk factors for persistence and recurrence. *Cancer Letters* 196 (2003) 127–134.

- Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M, 2001: Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* 75, 1565-1570.
- González M, Polanco G, Puerto M, Murguía P. Factores asociados al papilomavirus humano en mujeres mexicanas. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología* vol. 53 no 3 2002.
- Guerrero I, Mejía R, Velazco R, Misad O, Pow M., Oncogenes e6-e7 de los papilomavirus humanos de alto riesgo detectados por pcr en biopsias de pene incluidas en parafina. *Rev Med Exp* 1999, XV (1-2).
- Harper D, Franco E, Wheeler C, Moscicki A, Romanowski B, Roteli C, et al. Sustained efficacy up to 4, 5 years or a bivalent L1 virus like particle vaccine against human papilloavirus tipos 16 an 18 in young women a randomized controlled trial. *Lacet* 2004, 634: 1757-65
- Hans-Ulrich B, The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J. of Clinical Virology* 2005 32S. S1-S6.
- Holowaty P, Miller AB, Rohan T. Natural dysplasia of the uterine cervix. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999 91: 252-258
- Kim, JJ: Mathematical models to explore HPV vaccine implementation for cervical cancer prevention. Comunicación al III Foro Internacional de Vacunas. 19 Octubre 2006, Madrid
- Koutsky LA, Holmes KK, Crichtlow CW, et al. cohort study of the risk of cervical intraepitelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992; 327: 1972-8.

- Koutsky LA, Harper DM. Current findings from prophylactic HPV vaccine trials. *Vaccine* 2006; 24 (Suppl.3): S3/114-21.
- Leal Garza C, Cortés Gutiérrez E. Detección molecular del virus del papiloma humano en mujeres con cáncer cervicouterino, *Gaceta Medicina México* 1996; Volumen 132 (3): 296-300.
- López A, Lizano M. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer. UNAM - INCan. Subdirección de investigación básica. Instituto Nacional de Cancerología. México 2006.
- López M, Anzola M, Cuevas N, Aguirre J, Martínez de Pancorbo. Aplicaciones clínicas del diagnóstico de las alteraciones de p53 en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (p53 en el CECC). *Medicina Oral* Vol. 7 / N.º 2 2002.
- Magnusson PKE, Lichtenstein P, Gyllenstein UB, 2000: Heritability of cervical tumors. *Int. J. Cancer*, 88: 698-701
- Mahecha J, Cáncer de cuello uterino: hacia una historia social de la enfermedad. Grupo de investigación en Cáncer de Cuello Uterino y Mama. Universidad Caldas, Manizales. 2000.
- Medina M. Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia 1990, 1, Instituto Nacional de Cancerología; 1994:76-77.
- Munger K, Basile JR, Duensing S, 2001: Actividades biológicas y blancos moleculares de la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano. *Oncogen*. 20: 7888–98.

- Muñoz N, Bosch FX, Cáncer del Cervix y virus del papiloma humano: evidencia epidemiológica y perspectivas para su prevención. Salud Pública México 1997; 39: 388 - 396.
- Muñoz N, Castellsague X, Berrington A, Lutz Gissmann. HPV in the etiology of human cancer. Vaccine 24S3 (2006) S3/1–S3/10.
- Muñoz N, Bosch FX. Cervical cancer and human papillomavirus: Epidemiological evidence and perspectives for prevention. Salud Publica Mex 1997;39: 274-282.
- Ordi J, P16 y cérvix uterino. Valor en la detección de lesiones ocultas y en la mejora de la concordancia. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Clínic. Barcelona.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisan P. Estimating the World cancer burden: Globocan. Int J Cancer; 2001 94 (2):153-156.
- Piñeros M, Ferlay J, Murillo R. Incidencia estimada de cáncer en Colombia a nivel departamental y nacional. Salud Publica México 2006;48: 455-465.
- Puig - Tintore LM, Jou Collel P. Carcinogénesis del cuello uterino. Papel del papillomavirus humano (HPV). Enf trans Sex 1988; 2: 67.
- PVH – Fast, Detección y tipado de papilomavirus humano mediante identificación genómica. Genómica.2003; versión 1.2.
- Redondo Cesar, Herrera Sandra. 2004. Registro poblacional de Cáncer en Colombia. Instituto Nacional de Cancerología. Comunicación personal.

- Rivera R, Delgado J, Painel V, Barrero R, Larraín A. Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical. *Revista Chilena de Obstetricia y ginecología* 2006; 71(2): 135-140.
- Salazar E, González J, Olmos A, Calzada L. Influencia del uso de anticonceptivos orales como factores de riesgo para infección por virus del papiloma humano y neoplasia intraepitelial cervical. *Ginecol Obstet Mex* 2005;73: 83-89.
- Sánchez, V, Valencia, G, A Marlenys, Perspectivas en la detección y control del virus de papiloma humano. *Bioanálisis: revista de la Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad de Antioquia*, 2001 Vol. 1, N° 1.
- Sanclemente G., Lo que los clinicos deben saber acerca de las vacunas contra el VPH. *Gaceta Médica de Mexico*. Vol 139 No 2 Marzo 2003.
- Sherman L, Jackman A, Itzhaki H, 1997: Inhibition of serum - and calcium – induced differentiation of human keratinocytes by HPV 16 E6 oncoprotein: role of P53 inactivation. *Virology*. 237: 296–306
- Sherris J, Friedman A, Wittet S, Davies P, Steben M, Saraiya M. Education, training and communication for HPV vaccines. *Vaccine* 2006; 24 (Supl 3): S3/210-18.
- Taja L, Salcedo M, Osornio A. Presencia de la proteína tardía del virus del papiloma humano en tejido cervicouterino con lesiones de bajo y alto grado de malignidad. *Rev Ins Nal Cancero* 1996; Volumen 42 (4):181-187.

- Tirado LL, Mohar A, López M, García A, Franco F, Borges G. Factores de riesgo de cáncer cérvicouterino invasor en mujeres mexicanas. Salud Pública Mex 2005; 47: 342-350.
- Vilaplana E, Bernaola E, Rodrigo C, Gil A, Vidart J, De Juanes J, Poveda A, De Paredes M. Vacunas Profilacticas frente al VPH. Grupo Sanofi Pasteur MSD 2007.
- Villa LL, Ault KA, Giuliano AR, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, et al. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18. Vaccine. 2006;24:5571-83.
- Xercavins J, Gil A, Centeno C., Virus y cáncer genital. Ediciones Ergon, S.A. C/ Arboleda, 1. 28220 Madrid 2002
- Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst 2000;92:690.

ANEXOS

ANEXO 1. FORMATO DE ENCUESTA PARA RECOLECCION DE DATOS

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE MEDICINA

Grupo de Investigación de Microbiología y Ciencias Ambientales
Proyecto : VPH-p16-genotipos-AAC 2p 2007

ENCUESTA PARA OBTENCION DE DATOS DE VARIABLES fecha d-m-a: _____ **Código de Muestra en UdeC MD:** PP- _____
No de HISTORIA CLINICA (No cc): _____
cc: _____

DATOS PERSONALES

Nombre: _____ **Edad (años)** _____ T.I. PASAPORTE REGCI AS: MS: UN

Raza Mestiza Blanca Negra **Religión:** _____ Pa **CARNET** _____

Dirección _____ **Telefono** _____ **Estrato** _____

ASEGURADORA _____ COOSALUD DADIS DASALUD MUTUAL SER
CODIGO _____ Reg Subsidiado Regimen contributivo Reg Vinculado

Código Facturador: _____ **No DE FACTURA:** _____ **No de Autorización:** _____

FACTORES DE RIESGOS

Nivel Socio Económico: Bajo Medio Alto **Tabaquismo** _____
(>1paquete/d)

Dieta: ingesta de verduras y frutas (Vit A,C) Baja Media Alta

AP: Alcoholismo _____ **Farmaco Dependencia:** _____ **Alergias** _____ **A:** _____

AF: _____ **Tumores** _____

HISTORIA GINECO OBSTETRICA:

Edad de Menarquia _____ **Edad de primera Relación sexual:** _____ **G:** _____ **P:** _____ **A:** _____ **Fecha último parto** _____

Método de planificación _____ **tipo de relacion sexual** g-g o-g a-g **Número parejas sexuales** _____ **F.U.M.** _____

Tiempo de uso (meses): _____

Antecedentes de procedimientos en ÚTERO: _____

Colposcopia Cauterización Conización **No de citologías anteriores** _____

Radioterapia Histerectomía Legrado **Fecha procedimiento:** _____ **Fecha última citología** _____

Diagnósticos anteriores _____

CLASIFICACIÓN DE HALLAZGOS COLPOSCÓPICOS- IFCPC 2002

I. Hallazgos Colposcópicos Normales

A. Epitelio Escamoso original

B. Epitelio cilíndrico

C. Zona de transformación:

1. Totalmente visible en ectocérvix

2. Totalmente visible con componente endocervical

3. Con componente endocervical no totalmente visible

II. Hallazgos colposcópicos anormales

A. Epitelio acetoblancos

B. Punteado

C. Mosaico

D. Negatividad para Yodo o prueba de Schiller Positiva

E. Vasos atípicos

III. Características sugestivas de lesión de bajo grado

A. Superficie lisa con borde irregular

B. Cambio acetoblancos mínimo

C. Positividad leve para yodo, parcialmente moteada

D. Punteado fino y mosaico fino y regular

IV. Características sugestivas de lesión de alto grado

A. Superficie lisa con borde externo bien definido

B. Cambio acetoblancos denso que aparece pronto y desaparece lentamente

C. Color acetoblancos denso en los orificios glandulares

D. Negatividad para el yodo en epitelio intensamente blanco

E. Punteado grueso y mosaico extenso e irregular

V. Características sugestivas de cáncer invasor

A. Superficie irregular, erosiva o ulcerada

B. Cambio Aceto Blanco denso

C. Punteado y mosaico extenso e irregular

D. Vasos atípicos

VI. Colposcopia Insatisfactoria

A. Unión escamocolumnar no visible

B. Asociación con traumatismo

C. No se visualiza el cervix

VII. Hallazgos diversos

A. Condilomas C. Erosión

B. Queratosis D. Otros.

B I O P S I A TOMADA DURANTE COLPOSCOPIA EN:

Vulva Vagina Exocervix Endocervix Endometrio LEEP Polipectomía

IMPRESION CLINICA DEL COLPOSCOPISTA _____ **Firma de Colposcopista** _____

HISTOPATOLOGÍA **Fecha:** _____ **Codigo del reporte:** _____

DESCRIPCION MICROSCOPICA: _____

DIAGNOSTICO HISTOPATOLOGICO FINAL _____

Material inadecuado o insuficiente para diagnóstico Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado

Fragmentos de Cervix normal Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (NIC II)

Cervicitis Adenocarcinoma in situ

Cervicitis con cambios de metaplasia escamosa Adenocarcinoma infiltrante

RESULTADOS DE LA ÚLTIMA CITOLOGIA			
MOTIVO DE CONSULTA	Nombre de quien ordena la citología:		Cargo
FECHA DE TOMA DE MUESTRA	Tomada por:	FECHA DE LECTURA	
EVALUACION DE LA CALIDAD DE LA MUESTRA		RESULTADOS :	
<input type="checkbox"/> Satisfactoria	<input type="checkbox"/> Muestra insuficiente	<input type="checkbox"/> Citología Normal	<input type="checkbox"/> Citología anormal
<input type="checkbox"/> Muy grueso	<input type="checkbox"/> Favor repetir, no se puede informar por:	<input type="checkbox"/> Extendido negativo para neoplasia:	<input type="checkbox"/> No se sabe resultado de citología:
<input type="checkbox"/> Mal fijado	<input type="checkbox"/> Limitada para el diagnóstico	<input type="checkbox"/> Citología anormal compatible con:	<input type="checkbox"/> Adenocarcinoma
<input type="checkbox"/> Muy hemorrágico	<input type="checkbox"/> Solo exudado inflamatorio	<input type="checkbox"/> LIE de bajo grado	<input type="checkbox"/> ASC
Otros		<input type="checkbox"/> ASUS	<input type="checkbox"/> CA escamocelular
		<input type="checkbox"/> LIE de alto grado	<input type="checkbox"/> Condiloma plano (PAP):
		OTROS resultados citológicos:	
		Evidencia de cambios sugestivos de infección por VPH:	
		Observación:	
COLPOSCOPIA Actual fecha d-m-a:			
REALIZADA POR: <input type="checkbox"/> DR ORLANDO BORRE <input type="checkbox"/> DR SERGIO GIRADO			
Aspecto del cuello antes de aplicar Yodo o Acido Acético:			
VULVOSCOPIA:			
VAGINOSCOPIA:			
CERVICOSCOPIA:			
OBSERVACIONES:			

EXAMEN EN FRESCO Y GRAM DE SECRECION VAGINAL. Fecha (d m a):			
Exámen en fresco:			
Consistencia:	Cantidad:	pH	KOH para Gardnerella:
Células epiteliales / campo:		Coloración de Gram:	
Leucocitos / campo:		Respuesta leucocitaria:	
Hemáties/ campo:		Flora vaginal:	
Células Guías / campo:		Flora Vaginal:	
Bacterias / cruces:		Células Guía por campo:	Gardnerella: (cruces):
Moco / cruces:		PMNN por campo:	
Hongos Levaduras/ cruces:		Lactobacillus por campo:	
Hongos:			
Blastoconidias/cruces:			
Hongos: Micelios/cruces:			
Trichomonas / cruces:			
ESTUDIOS DE BIOLOGIA MOLECULAR E INMUNOHISTOQUIMICA			
PCR PVH Y GENOTIPO fecha d-m-a :		INMUNOHISTOQUIMICA (P16) Fecha d-m-a:	
Resultado: del proceso de extracción de DNA:			
Presencia de ácido nucleico de PVH		PATRON DE LECTURA:	
		<input type="checkbox"/> DIFUSO INTENSO <input type="checkbox"/> FOCAL DISPERSO <input type="checkbox"/> FOCAL AISLADO	
Genotipo (identificados):		Escala de Sano (% de CÉLULAS TENIDAS NU... Y... CITOP):	
<input type="checkbox"/> Genotipo 16 <input type="checkbox"/> Genotipo 18 <input type="checkbox"/> Genotipo 58			
Observaciones...		Resultado:	
		Observaciones..	
PEDIR FIRMA CONSENTIMIENTO INFORMADO AL PACIENTE		FIRMA ENCUESTADOR	

ANEXO 2. CONSETIMIENTO INFORMADO

Con el presente documento se pretende informar a usted y a su familia sobre el procedimiento que se le practicara por lo que le solicitamos diligenciar con su puño y letra en los espacios en blanco.

La paciente _____ de
_____ años C.C. N° _____ de
_____ y/o el señor (a)
_____ en calidad de _____

DECLARAN

Que _____ identificado con C.C.
N° _____ de _____ ha sido
claro y preciso en suministrarme la información sobre la toma de muestras para
el proyecto Búsqueda del marcador de progresión p16INK4a en las Lesiones
Intraepiteliales Escamosas Cervicales (LIE) asociadas a Papillomavirus
Humano, en mujeres de Cartagena de Indias.

Responda **SI** o **NO** en los espacios en blanco.

He recibido información del procedimiento en un lenguaje claro y sencillo. _____

Se me ha permitido todas las observaciones y preguntas al respecto. _____

También comprendo que sin necesidad de dar ninguna explicación

ACEPTO EN PARTICIPAR EN EL PROYECTO: Búsqueda del marcador de
progresión p16INK4a en las Lesiones Intraepiteliales Escamosas Cervicales
asociadas a Papillomavirus Humanos, en mujeres de Cartagena de Indias, y
autorizo practicar el procedimiento de toma de biopsias.

Firma Paciente.