



**BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE SAN LUIS POTOSÍ**



FACULTAD DE ENFERMERÍA Y NUTRICIÓN

MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA

**VARIABILIDAD DEL DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO A LA
EXAMINACIÓN DE DIFERENTES NIVELES EN EL BLOQUE DE
PARAFINA DE BIOPSIA DE IVPH, NIC Y CACU**

Tesis

Para obtener el grado de Maestría en Salud Pública

PRESENTA:

L.E. EDGAR VILLEGAS HINOJOSA

DIRECTORA:

DRA. LUZ EUGENIA ALCÁNTARA QUINTANA

CO-ASESORAS:

**DRA. VERÓNICA GALLEGOS GARCÍA
DRA. YOLANDA TERÁN FIGUEROA**

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P., SEPTIEMBRE DE 2018



**BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE ENFERMERÍA Y NUTRICIÓN**



MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA

**VARIABILIDAD DEL DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO A LA
EXAMINACIÓN DE DIFERENTES NIVELES EN EL BLOQUE DE
PARAFINA DE BIOPSIA DE IVPH, NIC Y CACU**

Tesis

Para obtener el grado de Maestría en Salud Pública

PRESENTA:

L.E. Edgar Villegas Hinojosa

DIRECTORA:

Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana

CO-ASESORAS:

Dra. Verónica Gallegos García

Dra. Yolanda Terán Figueroa

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P., SEPTIEMBRE DE 2018



**BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE ENFERMERÍA Y NUTRICIÓN
MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA**



**VARIABILIDAD DEL DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO A LA
EXAMINACIÓN DE DIFERENTES NIVELES EN EL BLOQUE DE
PARAFINA DE BIOPSIA DE IVPH, NIC Y CACU**

**Tesis
Para obtener el grado de Maestría en Salud Pública**

PRESENTA:

L.E. Edgar Villegas Hinojosa

SINODALES

Dr. Dario Gaytán Hernández

Presidente

Dra. Verónica Gallegos García

Secretaria

Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana

Vocal

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P., SEPTIEMBRE DE 2018

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Dr. Vicente Madrid Marina, a la M en CP. Margarita Bahena Román, a la Dra. Carla Contreras Ochoa, a todos los compañeros y amigos del Laboratorio 4 planta baja por el apoyo recibido durante mi estancia de investigación en el Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública.

Al Fondo académico institucional de la UASLP, por el apoyo para el proyecto para esta investigación.

A la Beca CONACYT de fondos mixtos por el apoyo para la estancia nacional.

A la Patóloga Anahíd Elizabeth Campuzano Barajas por brindarme su conocimiento en el proceso de aprendizaje para la lectura de las laminillas.

A las autoridades del Hospital General de Soledad por permitirme realizar el proyecto en su institución.

Al Dr. Cuauhtémoc Oros Ovalle, a las histotecnologas y en especial a Minerva Guadalupe Linares Sánchez del Hospital Central por apoyarme en todo el proceso de aprendizaje para el corte de los bloques de parafina.

A mi directora de tesis Dra, Luz Eugenia Alcántara Quintana por todo el apoyo incondicional para llevar a cabo este proyecto ya que siempre fue una persona dedicada y comprometida a lo que se requirió.

A la Dra. Yolanda Terán Figueroa por estar ahí en todo momento que se requirió.

A la Dra. Verónica Gallegos García por el por el compromiso dedicado al proyecto, sus asesorías, paciencia, dedicación, pero sobre todo por su amistad.

A mis amigos en especial a Omar, Fabiola, Diana, Viridiana, Fátima, Iván, David, Ana Luisa, Yadhira, Perla, Pao e Isabel, por estar siempre conmigo en todo.

DEDICATORIA

A mis padres que gracias a sus consejos y palabras de aliento me han ayudado a crecer como persona y a luchar por lo que quiero, gracias por enseñarme valores que me han llevado a alcanzar todas mis metas.

A mis hermanos, por su apoyo, cariño y por siempre estar en los momentos más importantes de mi familia, este logro también es de ustedes.

RESUMEN

Introducción. El estudio histopatológico proporciona un diagnóstico para así dar pauta sobre la base del cual será el seguimiento de las pacientes, no obstante, se han sugerido ciertas mejoras metodológicas para aumentar su certeza. **Objetivo.** Determinar la variación del diagnóstico histopatológico al examinar 3 niveles más en el bloque de parafina de biopsia de los diferentes grados de NIC, IVPH y CaCu. **Metodología.** Estudio correlacional retrospectivo; se trabajó con 152 bloques de parafina de biopsia con algún grado de NIC, IVPH y CaCu. Se examinó 3 niveles más con un desbaste de 50 micras entre cada nivel para posteriormente correlacionarlo con el diagnóstico inicial emitido por la institución, se extrajo el DNA, de los bloques de parafina con biopsia se genotipificó los principales VPH y se cuantificó la carga viral. **Resultados.** Se percató que el 46.9% del diagnóstico inicial por IVPH, era por una NIC I; el diagnóstico de NIC I, el 12.9% , correspondía a NIC II; en cuanto al NIC II, se encontró que el 26.7% era por NICIII y un caso (3.3%) por CaCu *in situ*; para NIC III, el 31% era por un CaCu *in situ*; y el CaCu *in situ*, el 7.1% era en realidad por CaCu invasor; todo esto con un valor de ($p < 0.05$). Los principales genotipos encontrados fueron el VPH-31 (68%) y -16 (22%); co-infecciones como VPH-16, -31 (44%) y VPH-18 -31 (14%). Finalmente la carga viral no se correlacionó con el diagnóstico histopatológico con un coeficiente de correlación de spearman del 0.072.

Palabras clave. Diagnóstico histopatológico, niveles, NIC, CaCu.

ABSTRACT

Introduction. The histopathological study provides a diagnosis in order to give a guideline on the basis of which will be the follow-up of patients, however, certain methodological improvements have been suggested to increase its certainty.

Objective. Determine the variation of the histopathological diagnosis by examining 3 more levels in the paraffin block biopsy of the different grades of CIN, IVPH and CC. **Methodology.** Retrospective correlational study; We worked with 152 blocks of paraffin biopsy with some degree of NIC, IVPH and CC. Three additional levels were examined with a 50 micron slab between each level to later correlate it with the initial diagnosis issued by the institution, DNA was extracted, the paraffin blocks with biopsy were genotyped the main HPV and the viral load was quantified.

Results. He noticed that 46.9% of the initial diagnosis by IVPH was for an IAS I; the diagnosis of CIN I, 12.9%, corresponded to CIN II; as for the CIN II, it was found that 26.7% was by CIN III and one case (3.3%) by CC in situ; for CIN III, 31% was for a CC in situ; and the CC in situ, 7.1% was actually by invasive CC; all this with a value of ($p = <0.05$). The main genotypes found were HPV-31 (68%) and -16 (22%); co-infections such as HPV-16, -31 (44%) and HPV-18 -31 (14%). Finally the viral load did not correlate with the histopathological diagnosis with a spearman correlation coefficient of 0.072.

Keywords. Histopathological diagnosis, levels, CIN, CaCu.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| DEDICATORIA | 5 |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 4 |
| 2.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN..... | 8 |
| III. MARCO TEÓRICO | 9 |
| 3.1 ANATOMÍA DEL CUELLO UTERINO | 9 |
| 3.2 FISIOLÓGÍA DEL CUELLO UTERINO | 10 |
| 3.2.1 Epitelio escamoso..... | 10 |
| 3.2.2 Epitelio glandular endocervical | 12 |
| 3.2.3 Zona de transformación | 13 |
| 3.3 CÁNCER..... | 13 |
| 3.4 GENERALIDADES DEL CÁNCER CERVICOUTERINO..... | 14 |
| 3.5 AGENTE CAUSAL: VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO | 16 |
| 3.6 NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL | 19 |
| 3.7 CÁNCER CERVICOUTERINO..... | 22 |
| 3.8 METODOS DE TAMIZAJE..... | 24 |
| 3.8.1. Estudio histopatológico..... | 25 |
| 3.8.2 Técnicas moleculares para la detección de VPH | 26 |
| 3.8.3 Carga viral del DNA del VPH | 27 |
| IV. HIPÓTESIS..... | 28 |
| V. OBJETIVOS..... | 29 |
| 5.1 GENERAL..... | 29 |
| 5.2 ESPECÍFICOS | 29 |
| VI. METODOLOGÍA | 30 |
| 6.1 TIPO DE ESTUDIO..... | 30 |
| 6.2 DISEÑO METODOLÓGICO | 30 |
| 6.3 LÍMITES DE TIEMPO Y ESPACIO | 30 |
| 6.4 UNIVERSO..... | 30 |
| 6.5 MUESTRA Y TIPO DE MUESTREO..... | 30 |
| 6.6 CRITERIOS DE ESTUDIO | 31 |

| | |
|--|----|
| 6.6.1 De inclusión | 31 |
| 6.6.2 De exclusión | 31 |
| 6.6.3 De eliminación..... | 31 |
| 6.7 VARIABLES | 31 |
| 6.7.1 Variable independiente..... | 31 |
| 6.7.2 Variable dependiente..... | 31 |
| 6.7.3 Operacionalización de las variables | 31 |
| 6.8 PROCEDIMIENTOS | 31 |
| 6.8.1 Recolección de muestras..... | 31 |
| 6.8.2 Técnica Histológica..... | 32 |
| 6.8.2.1 Corte..... | 32 |
| 6.8.3 Técnica de obtención de tejido de cérvix a partir del bloque de parafina. | 33 |
| 6.8.4 Técnica para desparafinar tejido de cérvix a partir del bloque de parafina | 34 |
| 6.8.5 Técnica de extracción de ADN a partir de tejido de biopsia de cérvix..... | 34 |
| 6.8.6 Cuantificación, integridad y pureza del ADN | 35 |
| 6.8.7 Genotipificación con PCR tiempo real con SYBR Green | 35 |
| 6.8.9 Cuantificación de carga viral y genotipificación a través de PCR tiempo real | 37 |
| 6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 38 |
| 6.9.1 Análisis de los datos de qPCR tiempo real | 38 |
| 6.9.2 Análisis estadístico | 39 |
| 6.10 RECURSOS | 40 |
| 6.10.1 Recursos humanos | 40 |
| 6.10.2 Recursos Financieros..... | 40 |
| 6.11 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES | 40 |
| VII. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y LEGALES..... | 41 |
| 7.1 BENEFICIOS ESPERADOS PARA LA POBLACIÓN | 41 |
| 7.2 NIVEL DE RIESGO | 41 |
| 7.3 CARTA DE NO CONFLICTO DE INTERESES Y DERECHO DE AUTORIA Y CO-AUTORIA | 41 |
| 7.4 NORMAS NACIONALES E INTERNACIONALES..... | 42 |
| 7.4.1 Nacionales | 42 |
| 7.4.2 Internacionales..... | 43 |
| VIII. RESULTADOS | 45 |

| | |
|---------------------------------------|----|
| IX. DISCUSIÓN..... | 52 |
| X. CONCLUSIÓN | 58 |
| XI. RECOMENDACIONES | 59 |
| XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 60 |
| XIII. ANEXOS | 68 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Sección transversal de la pelvis a nivel del cuello uterino ²⁹ . | 9 |
| Figura 2. Zona de transformación del cérvix ³⁰ . | 10 |
| Figura 3. Epitelio escamoso normal del cuello uterino. | 11 |
| Figura 4. Mucosa endocervical normal ²⁹ . | 12 |
| Figura 5. Endocérvix normal ²⁹ . | 12 |
| Figura 6. Zona de transformación del cérvix ²⁹ . | 13 |
| Figura 7. Incidencia por Cáncer Cervicouterino en el mundo en el año de 2012. | 15 |
| Figura 8. Patogenia del virus del papiloma humano ¹⁷ . | 18 |
| Figura 9. Lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado ²⁹ . | 18 |
| Figura 10. Lesión intraepitelial escamosa cervical de bajo grado por IVPH (NIC I). | 21 |
| Figura 11. Lesión intraepitelial escamosa . | 21 |
| Figura 12. Mitosis atípica . | 21 |
| Figura 13. . Lesión intraepitelial escamosa cervical de alto grado por IVPH (NIC III). | 22 |
| Figura 14. Lesión intraepitelial escamosa cervical de alto grado por IVPH (Carcinoma in situ). | 22 |
| Figura 15. Carcinoma micro invasor ²⁹ . | 23 |
| Figura 16. Carcinoma invasor ²⁹ . | 23 |
| Figura 17. Perla cornea. | 23 |
| Figura 18. Diagnóstico de lesión no visible macroscópicamente ⁵⁰ . | 24 |
| Figura 19. Corte del bloque de parafina a diferentes niveles. | 33 |
| Figura 20. Principales cambios y resultados a la examinación de los diferentes niveles de los bloques de parafina. | 45 |
| Figura 21. Cambio del diagnóstico inicial al segundo nivel del bloque de parafina. | 46 |
| Figura 22. Cambio del diagnóstico inicial al tercer nivel del bloque de parafina. | 47 |
| Figura 23. Cambio del diagnóstico inicial al cuarto nivel del bloque de parafina. | 48 |
| Figura 24. Controles negativos de la amplificación a los genotipos virales del VPH . | 73 |
| Figura 25. Muestras amplificadas para VPH 16 . | 74 |
| Figura 26. Muestras amplificadas para VPH 18 . | 74 |
| Figura 27. Muestras amplificadas para VPH 31 . | 74 |
| Figura 28. Curva de melting de muestras positivas para VPH-16. | 75 |
| Figura 29. Curva de melting de muestras positivas para VPH-18. | 75 |

| | |
|---|----|
| Figura 30. Curva de melting de muestras positivas para VPH-31..... | 76 |
| Figura 31. Número de Cts positivos para los genotipos de VPH-16, -18 y -31..... | 76 |
| Figura 32. Producto de amplificación para genotipo de VPH-16..... | 77 |
| Figura 33. Producto de amplificación para genotipo de VPH-18..... | 78 |
| Figura 34. Producto de amplificación para genotipo de VPH-31..... | 79 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Clasificación citológica de lesiones cervicales ²⁹ | 20 |
| Cuadro 2. Estratificación de la muestra por distintos grados de NIC, IVPH y CaCu. | 30 |
| Cuadro 3. Secuencias de oligos para RNA mensajeros de EVPH-16, EVPH-18, EVPH-31, EVPH-33. | 36 |
| Cuadro 4. Condiciones para amplificación para EVPH-16, EVPH18 y EVPH-31. | 36 |
| Cuadro 5. Genotipos de VPH de alto riesgo que se amplificaron. | 37 |
| Cuadro 6. Condiciones de amplificación para qPCR. | 38 |
| Cuadro 7. Canales para detectar los diferentes genotipos virales. | 39 |
| Cuadro 8. Concordancia de diagnósticos histopatológicos. | 48 |
| Cuadro 9. Análisis descriptivo de la carga viral. | 49 |
| Cuadro 10. Correlación del diagnóstico histopatológico y carga viral. | 49 |
| Cuadro 11. Principales genotipos por VPH encontrados por lesiones cervicales. | 50 |
| Cuadro 12. Principales co-infecciones por VPH encontrados en lesiones cervicales. | 51 |

I. INTRODUCCIÓN

El Cáncer Cervicouterino (CaCu) es considerado un problema de salud pública, esta enfermedad tiene alta magnitud y trascendencia, afecta principalmente a mujeres vulnerables y en situación de pobreza, provocando un efecto negativo de la fuerza laboral, al igual que en sus familias y comunidades, ya que se pierden prematuramente jefas de familia, madres, esposas y abuelas, que tiene roles importantes e irremplazables en la sociedad^{1,2}.

Existe evidencia científica que ha demostrado que a partir de diversos estudios moleculares, epidemiológicos, virológicos y clínicos, describen y demuestran de forma inequívoca que el CaCu, es en realidad, es el resultado a largo plazo de una infección persistente por diferentes genotipos de la Infección por Virus de Papiloma Humano (IVPH), que es principalmente un virus de transmisión sexual. Por lo tanto de esta manera se asevera que el CaCu es el secuela final de una enfermedad venérea no resuelta³.

Los epidemiólogos continúan concentrándose en el estudio del cáncer cervical debido a su prevalencia global además porque provee un excelente modelo epidemiológico-molecular de carcinogénesis. Los pasos mayores en la fisiopatología de esta enfermedad en el cuello de útero implican la infección por VPH, persistencia de la misma, progresión a lesiones pre-cancerígenas y la invasión. No existe un consenso aún sobre el periodo de tiempo que implica la persistencia viral, pero entre varios meses y hasta un año es la ventana que usualmente se sugiere. La mayoría de las infecciones prevalentes por el VPH permanecen detectables por Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) entre 6-12 meses, mientras que para la manifestación se maneja un periodo de tiempo de entre 1-2 años⁴.

El mecanismo fisiopatológico del CaCu aceptado establece que la persistencia de infección con IVPH se acompaña de diferenciación de

queratinocitos, aumento de la amplificación del genoma viral, represión de genes tardíos (L) e incremento de la expresión de genes tempranos (E) en las células superficiales diferenciadas del epitelio cervical. El ADN viral comúnmente se integra al ADN celular. La inmortalización celular ocurre cuando se alteran las proteínas virales E1/E2 lo cual produce un aumento en la transcripción de las oncoproteínas E6/E7. Estas causan la inactivación subsecuente de las proteínas supresoras de tumores p53 y retinoblastoma, que participan en la reparación del ADN y evitan la transformación de las células epiteliales normales en células cancerosas⁵. Como consecuencia a largo plazo la unión escamocolumnar de la zona de transformación del epitelio cervical se tiene como resultado alteraciones citopáticas como una Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), que puede desarrollar a un cáncer invasor⁴.

El uso de métodos combinados para la detección del CaCu mejora el grado de confianza de su diagnóstico. Los métodos eficaces para la detección temprana de las lesiones pre cancerosas como el Papanicolaou (PAP), la colposcopia, el estudio histopatológico, captura de híbridos y la PCR, han ayudado a bajar la recurrencia de CaCu invasivo, la valoración de las pacientes por medio de estos métodos permite diferenciar entre mujeres enfermas y sanas^{2,3}.

El diagnóstico de laboratorio de la IVPH depende de las técnicas moleculares tales como la captura de híbridos del ADN o de la amplificación del ácido nucleico. La PCR se ha implementado como un método para detectar un amplio espectro de tipos de VPH mucosotrópicos ya sea utilizando cebadores degenerados o de consenso^{6,7}. La PCR de tiempo real permite distinguir secuencias estrechamente relacionadas sobre la base de la amplificación, seguido de análisis de ADN⁵.

Sin embargo la histopatología es el estándar de referencia para el diagnóstico de las NIC y el CaCu y constituye un determinante para la vía de seguimiento y tratamiento de las pacientes. Además, la histopatología cervical

genera la pauta a definir los diagnósticos para los resultados epidemiológicos de la carcinogénesis cervical, además de la precisión de las demás pruebas diagnósticas⁸. Es así como el estudio histopatológico parte del análisis de una de la zona de lesión y genera un método diagnóstico de certeza⁹.

No obstante, se han sugerido ciertas mejoras metodológicas; estudios previos refieren que al realizar un mayor número de cortes a diferentes niveles en el bloque de parafina de la biopsia de cérvix ha demostrado una mayor precisión, del estudio histopatológico, sólo en algunos tipos de lesiones cervicales^{10,11}.

Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación es determinar la variación del diagnóstico histopatológico al examinar 3 niveles más en el bloque de parafina de biopsia de los diferentes grados de NIC, IVPH y CaC.; que tiene como finalidad generar un diagnóstico más certero a nivel histopatológico al examinar más niveles en el bloque de parafina de biopsia, comparándolo bajo la metodología convencional de un solo corte.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CaCu representa un serio problema de salud pública a nivel mundial, ocupa el cuarto cáncer más común en población femenina y el séptimo a nivel general, en 2012 hubo un estimado de 528,000 casos nuevos; la gran mayoría de la carga de esta enfermedad a nivel mundial se produce en países subdesarrollados con un estimado de un 85%, del cual el 12% de este representa casi todos los cánceres femeninos. El CaCu sigue siendo el cáncer más habitual en las mujeres en el este de África y Oriente. En el año de 2012, hubo un estimado de 266,000 muertes por esta patología en todo el mundo, lo cual representa el 7.5% de todas las defunciones por cáncer en mujeres. Aproximadamente 9 de cada 10 (87%) muertes por esta enfermedad se producen en zonas menos desarrolladas¹².

En el año de 2016 el CaCu a nivel mundial tuvo una variación porcentual de 0.45% por mortalidad y en México para ese mismo año tuvo un 0.78%, lo que quiere decir que estamos a casi el doble por muertes en mujeres en comparación a nivel mundial debido a esta patología¹³. En México el CaCu, fue la principal causa de mortalidad por tumores malignos hasta el año de 2006, posteriormente después de ese año el cáncer de mama obtuvo una tasa de mortalidad más elevada hasta la fecha, sin embargo, el CaCu continua ocupando el primer lugar en trece estados de la República Mexicana, entre los cuales se encuentran: Jalisco, Nayarit, Veracruz, Guerrero, San Luis Potosí, entre otros¹⁴.

Actualmente esta patología ocupa el segundo lugar de morbilidad y mortalidad dentro de las patologías crónico degenerativas, siendo el responsable de 5,405 defunciones en el año de 2013 en mujeres, con una tasa de 16.3 muertes por 100,000 mujeres, cada año se estima una recurrencia de 13,960 casos, con una incidencia de 23.3 casos por 100,000 mujeres; en el grupo específico de la población femenina de 25 años y más, se registraron 3,771 defunciones con una tasa de 11.3 defunciones por 100,000 mujeres^{15,16}.

El agente causal para el desarrollo de los diferentes cánceres ano-genitales es el virus del papiloma humano, este se ha convertido significativamente en una causa primordial de mortalidad y morbilidad en todo el mundo^{17,18}, para el desarrollo del CaCu, algunos estudios reportan que el 98.5% de los casos tuvieron algún antecedente de IVPH de alto riesgo y se considera necesario más no suficiente para la evolución de esta enfermedad¹⁹. Se calcula que más de la mitad de todos los adultos con vida sexualmente activa contraerán esta infección en alguna parte de su vida, sin embargo este tipo de infecciones pueden llegar resolverse espontáneamente o también pueden llegar a manifestarse en alguna displasia que puede llegar a desarrollarse a cáncer²⁰.

México invierte 6.5% de su producto interno bruto en salud, del cual destina al Instituto Mexicano del Seguro Social, 92,535 millones de pesos, del cual invierte 63,140 pesos en atención en el primer año de atención y tratamiento por CaCu para un derechohabiente. Mientras que la Organización Mundial de la Salud, refiere que, “la inversión de prevenirla es de 4,000 pesos por año y el tratamiento de por vida es de 200,000 pesos”. Según estadísticas del 2008 se expresa que por año se identifican 68,220 casos de CaCu para lo cual se estima que, considerando el gasto de salud en un año por número de casos nuevos, se gastan 4,307,410,800 millones de pesos en tratamiento²¹.

El costo total para el diagnóstico de alguna lesión intraepitelial cervical en una institución pública es de 144 pesos, pero comparándolo con el costo del tratamiento sobre esta patología, que abarca exámenes de imagen, 21,647 pesos; consulta médica 17,029 pesos; radioterapia 8,706.00; hospitalización 8,250.00; da un total de \$ 64,485 siendo derechohabiente, es relativamente bajo²².

El esfuerzo para la prevención de la evolución del CaCu a nivel mundial se centra principalmente en el tamizaje de mujeres en situación de riesgo de contraer cualquier tipo de displasia cervical, utilizando los diferentes métodos diagnósticos y su posterior tratamiento de cualquier posible evolución a lesiones precancerosas²³. Actualmente se cuentan con diferentes pruebas diagnósticas

eficaces para la detección temprana de cualquier lesión intraepitelial cervical, como, el PAP, la colposcopia, el estudio histopatológico, la captura de híbridos y la PCR, estos métodos han demostrado su eficacia diagnóstica siempre y cuando se realice de manera oportuna²⁴.

Para que exista una buena calidad de las pruebas de tamizaje, se requiere un adecuado control interno y externo, que se necesita una prueba de referencia, la biopsia de cuello uterino y los especímenes quirúrgicos de cono del mismo. Los procedimientos mencionados anteriormente además de ser diagnósticos, se emplean también con fines terapéuticos, el manejo adecuado de estas muestras en el servicio de patología debe de ser óptimo para dar un adecuado seguimiento a las pacientes²⁵.

La histopatología proporciona el diagnóstico final sobre la base del cual se planifica el tratamiento y sirve como estándar de oro para el control de calidad de la citología y la colposcopia. La exactitud del diagnóstico histopatológico de las muestras de tejido depende de que estas muestras sean adecuadas, obtenidas mediante biopsias de punción dirigidas colposcópicamente o escisión de la zona de transformación o conización. Un diagnóstico histológico preciso depende además de la descripción macroscópica precisa, el procesamiento técnico, la interpretación microscópica y la gestión de la calidad que correlacionan el diagnóstico citológico e histológico²⁶.

En un estudio de Gage y colaboradores en 2015, en donde comparan los resultados histopatológicos con las mismas muestras, se identificó que existe una discordancia entre cada uno de los resultados, sobre todo en el diagnóstico de NIC II¹¹. Uno de los muchos factores a los que esto puede ser atribuible en teoría está relacionado con un error de muestreo del bloque de tejido incluido en parafina¹⁰.

En el marco del Plan Nacional de Desarrollo en materia de Salud 2013-2018, se plantea dentro de la meta de México incluyente, referente a mortalidad materna, en la Estrategia 2.5. “Mejorar el proceso para la detección y atención de

neoplasias malignas, principalmente CaCu, de Mama y Próstata” y en su numeral 2.5.3 refiere “Focalizar acciones de prevención y detección de cánceres, particularmente CaCu y CaMa”. Dentro de este PND, se incluye el Programa Sectorial de Salud, que en su objetivo número uno establece: “Consolidar las acciones de protección de la salud y prevención de enfermedades²⁷”.

Por lo anterior es importante realizar la presente investigación que tiene como objetivo determinar la variación del diagnóstico histopatológico al examinar 3 niveles más en el bloque de parafina de biopsia de los diferentes grados de NIC, IVPH y CaCu, cabe mencionar que en estudios anteriores se ha trabajado con diferentes neoplasias (I, II y III) sin embargo en este estudio se pretende indagar además también sobre en CaCu *insitu* y Cacu invasor, a todo esto se tendrá como finalidad generar un diagnóstico más certero a nivel histopatológico al examinar más número de niveles.

Los resultados del presente trabajo podrán contribuir a generar las bases científicas para continuar con investigaciones de este tipo y así en un futuro sugerir modificaciones de acuerdo a los resultados obtenidos a normas, guías y/o manuales de procedimientos de cada institución, ya que según la “NOM-014-SSA2-1994, para de la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cérvico uterino” sólo se sugiere que el estudio será a criterio de cada patólogo²⁸; así como también en la Organización Mundial de la Salud, habla sólo de la técnica para el estudio histopatológico, pero sin especificar el número de niveles a examinar.

Por lo tanto al modificar la técnica del estudio histopatológico se podrá dar pauta para generar un diagnóstico más certero con una base más solida para realizar el diagnóstico histopatológico y así ofrecer un tratamiento adecuado, oportuno para evitar el desarrollo del CaCu; contribuyendo en la toma de decisiones para la posible disminución de gastos catastróficos, en un futuro poder disminuir la morbimortalidad y principalmente ofrecer una mejor calidad de vida a

todas las mujeres que se encuentren en riesgo de padecer esta patología. Por todo lo anterior se presenta la siguiente pregunta de investigación:

2.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la variación del diagnóstico histopatológico al examinar 3 niveles más en el bloque de parafina de biopsia de los diferentes grados de NIC, IVPH y CaCu?

III. MARCO TEÓRICO

3.1 ANATOMÍA DEL CUELLO UTERINO

El cuello uterino representa de la mitad a un tercio de la longitud del útero. Mide 2.5 a 3.0 cm de largo y 2.0 a 2.5 cm de diámetro. La porción vaginal del cuello uterino (portio vaginalis, o ectocervix) está rodeada por un reflejo de la pared vaginal denominado fórnix. La porción del cuello uterino que se encuentra sobre el margen superior de la vagina se apoya en la parte anterior de la vejiga y se separa de ella por un tejido conectivo laxo que se extiende lateralmente hacia los ligamentos anchos.

Posteriormente, el cuello uterino superior está cubierto por peritoneo formando el revestimiento del fondo de saco. El tejido conectivo que rodea el cuello uterino y la vagina se extiende lateral y posteriormente hacia la segunda y cuarta vértebras dorsal como los ligamentos uterosacos. Sin embargo, el soporte principal del cuello uterino proviene de los ligamentos cardinales, que son bandas fibromusculares que se abren lateralmente desde el segmento uterino inferior, incluido el cuello uterino, hasta las paredes pélvicas laterales (figura 1)²⁹.

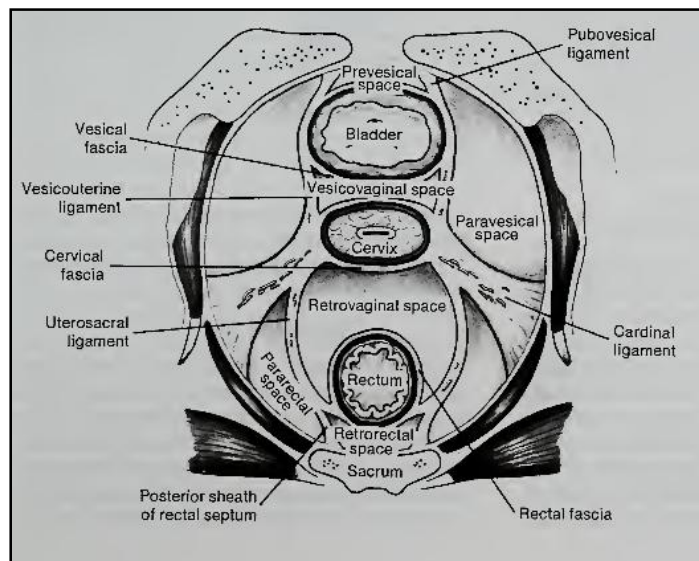


Figura 1. Sección transversal de la pelvis a nivel del cuello uterino²⁹.

3.2 FISIOLÓGÍA DEL CUELLO UTERINO

La mayor parte del cuello uterino está compuesta de tejido fibromuscular, de los cuales el tejido fibroso es el componente predominante. El epitelio que recubre el cuello uterino es de tres tipos: epitelio escamoso nativo, epitelio glandular y epitelio escamoso metaplásico. El área del cuello uterino donde el epitelio glandular se transforma metaplásicamente en epitelio escamoso se denomina zona de transformación o zona T (figura 2). La unión escamo-columnar es el margen más apical (superior) de la zona de transformación. En la unión escamo-columnar, el epitelio escamoso metaplásico se une al epitelio columnar. El conocimiento de las características colposcópicas y microscópicas del epitelio escamoso metaplásico y de la zona de transformación es importante para apreciar la patología de la neoplasia cervical²⁹.

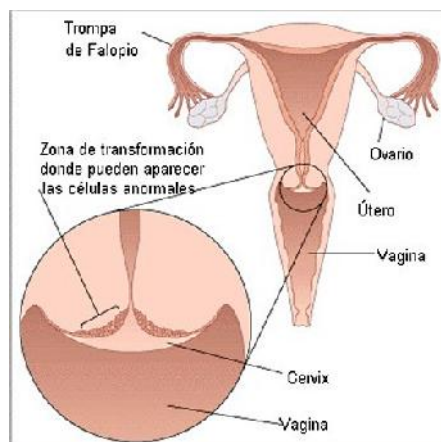


Figura 2. Zona de transformación del cérvix³⁰.

3.2.1 Epitelio escamoso

El epitelio está compuesto de células escamosas con un espectro de maduración, y se divide en tres zonas según el grado de maduración. El tercio inferior constituye la zona basal / parabasal, que está compuesta de células de reserva basales situadas perpendiculares a la membrana basal y células parabasales que

tienen núcleos ovales uniformes y citoplasma eosinófilo limitado. En el epitelio escamoso normal, la proliferación se limita a la zona basal / parabasal (Figura 3).

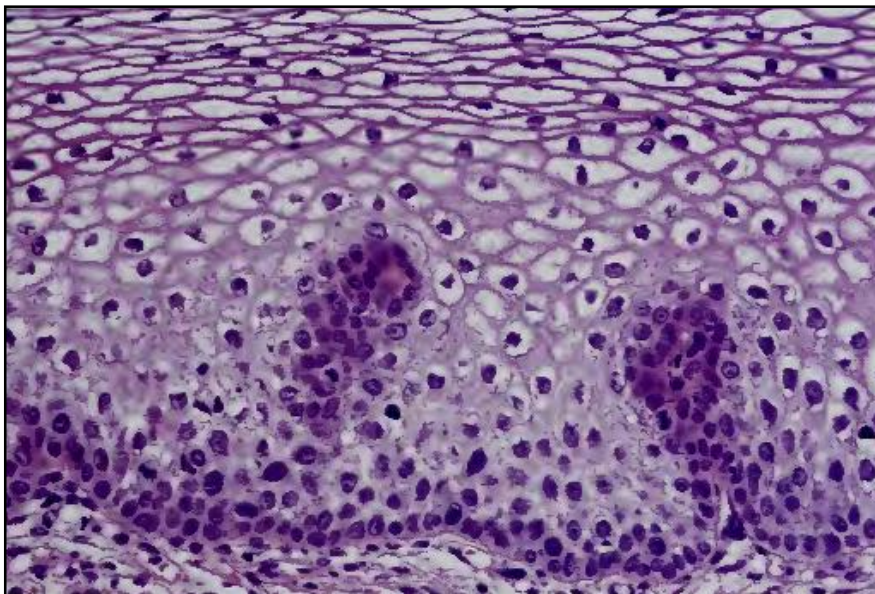


Figura 3. Epitelio escamoso normal del cuello uterino.

El epitelio escamoso maduro glicogenado se compone de tres zonas (parabasal, intermedia y superficial)²⁹.

En regiones donde la capa celular de reserva es prominente y distinta de las células parabasales, la inmunorreactividad para Ki-67, un marcador de proliferación, se limita a los núcleos de células parabasales (pero no de células de reserva). En el epitelio escamoso de maduración normal con actividad proliferativa leve en la zona parabasal, la capa de células de reserva puede ser menos visible y la actividad proliferativa de Ki-67 puede ser evidente en algunas células basales y parabasales (figura 3).

El tercio medio de la zona epitelial se designa como la zona intermedia y está formado por células con núcleos uniformes, redondos u ovalados, más pequeños y cantidades elevadas de citoplasma, lo que da como resultado células que tienen relaciones nuclear-citoplásmicas inferiores en comparación con las células parabasales. La maduración se produce en la zona intermedia y se manifiesta por un aumento en la cantidad de citoplasma y la acumulación de

abundante glucógeno. Esto es responsable de la apariencia clara y vacuolada de las células en las secciones de rutina y de su consumo de yodo con la prueba de Schiller (figura 3).

El tercio superior es la zona superficial, que contiene células escamosas maduras diferenciadas terminalmente que tienen citoplasma abundante y núcleos picnóticos pequeños, redondos a alargados (figura 3)²⁹.

3.2.2 Epitelio glandular endocervical

El epitelio endocervical, como lo muestran los estudios tridimensionales, no es verdaderamente glandular, sino que consiste en pliegues profundos del epitelio superficial en el estroma subyacente a una profundidad habitual de aproximadamente 5 mm, lo que da como resultado una arquitectura de la superficie papilar de la mucosa. En la sección transversal, los pliegues complejos parecen ser glándulas aisladas (figura 4). El epitelio glandular del cuello uterino se compone de una sola capa de células columnares con núcleos basales de redondo a ovalado y citoplasma finamente granular que contiene abundante mucina (figura 5).

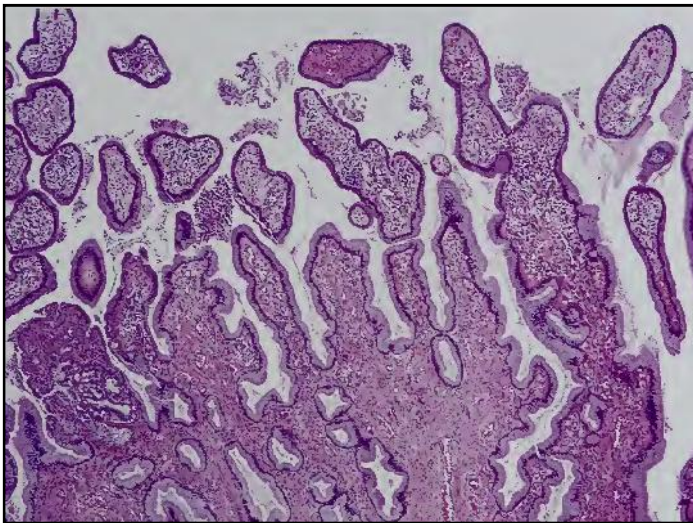


Figura 4. Mucosa endocervical normal²⁹.

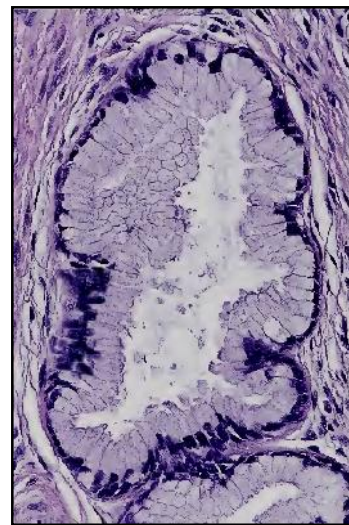


Figura 5. Endocérvix normal²⁹.

3.2.3 Zona de transformación

La zona de transformación está limitada distalmente por la unión escamocolumnar original y proximalmente por la nueva unión escamocolumnar (unión del epitelio quimio metaplásico y el epitelio glandular endocervical inalterado). La primera etapa de metaplasia reconocible con el colposcopio se caracteriza por el desarrollo de un esmalte ligeramente opaco sobre las estructuras vellosas en forma de uva, que corresponde al reemplazo del epitelio glandular por un epitelio metaplásico escamoso inmaduro. Las puntas de las estructuras vellosas se fusionan y luego desaparecen al ser reemplazadas por parches de epitelio metaplásico liso, ligeramente rosado (figura 6)²⁹.

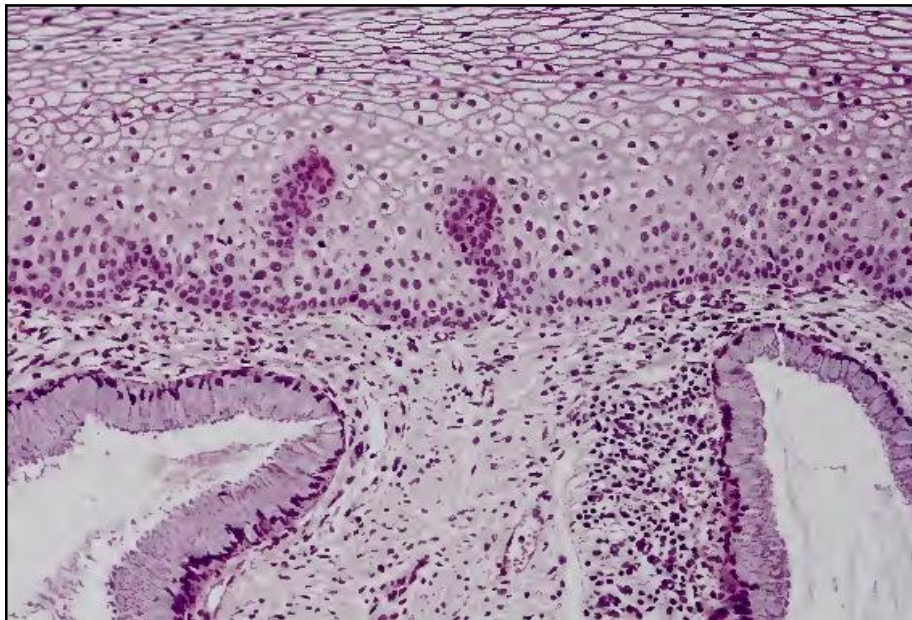


Figura 6. Zona de transformación del cérvix²⁹.

3.3 CÁNCER

Habitualmente, las células crecen y se dividen para así formar nuevas células a medida que el organismo del cuerpo humano así lo requiera, cuando estás envejecen o sufren algún tipo de daño, estas mueren y las células nuevas las

reemplazan³¹. Sin embargo el cáncer es una patología que se caracteriza por un proceso de crecimiento anormal y diseminado incontrolado de células, que al desarrollarse este, avanza hacia los tejidos normales y así alterar el funcionamiento del propio organismo. El tumor suele invadir el tejido circundante, en lugares inapropiados, propagándose indefinidamente, provocando metástasis en puntos distantes del organismo siendo letal para el mismo³⁰.

Para que aparezca algún tipo de cáncer, este se ve influenciado por diferentes factores para su desarrollo, tales como: los genéticos, factores extrínsecos e intrínsecos, convirtiendo así las células normales en células transformadas que dan lugar a procesos implicados en la formación de algunos tipos de tumores³².

La transformación de células anormales malignas en el organismo puede ocurrir de manera espontánea, pudiendo ser el resultado de algunas infecciones tumorales o cancerígenas. El criterio de severidad de aumento del tamaño nuclear se determina a una desproporción núcleocitoplásmica, hiperchromasia y con frecuencia gigantismo celular debido a hiperdiploidia o poliploidia, el cual es el resultado de una síntesis descontrolada de AND³³.

Existen 2 tipos de virus involucrados en el cáncer que son los del genoma del AND y los genomas de ARN; los virus tumorígenos modifican el funcionamiento de la célula infectada para así poder sobrevivir y su reproducción, ya que estos alteran los mecanismos del control celular, lo que provoca una variación en el crecimiento normal de las células, cambios genéticos y por consecuencia al desarrollo de algún tipo de neoplasia³⁴.

3.4 GENERALIDADES DEL CÁNCER CERVICOUTERINO

El CaCu constituye una de las enfermedades neoplásicas más frecuentes y mortales en la población femenina, siendo de las primeras causas de defunciones

por neoplasias malignas en el grupo de mujeres de 25 a 64 años, teniendo un alta trascendencia, ya que principalmente afecta a población femenina en estado de vulnerabilidad y en situación de pobreza, provocando como consecuencia un efecto negativo sectores de la fuerza laboral, social y familiares, ya que se pierden rápidamente jefas de familia, madres, esposas y abuelas, que tiene roles importantes e irremplazables en la sociedad¹.

La carga desproporcionalmente alta de la enfermedad y las tasas de incidencia elevada en los países en desarrollo entre ellos México (figura 7), tienen un origen: la poca demanda oportuna de PAP por la población blanco (y éstas acuden a su centro de salud cuando se presentan signos y síntomas, cuando la enfermedad se encuentra en una etapa más desarrollada), la falta de organización de los servicios de salud, carencia de infraestructura y pocos hospitales para el manejo de las pacientes con diagnóstico de CaCu^{35, 36}.

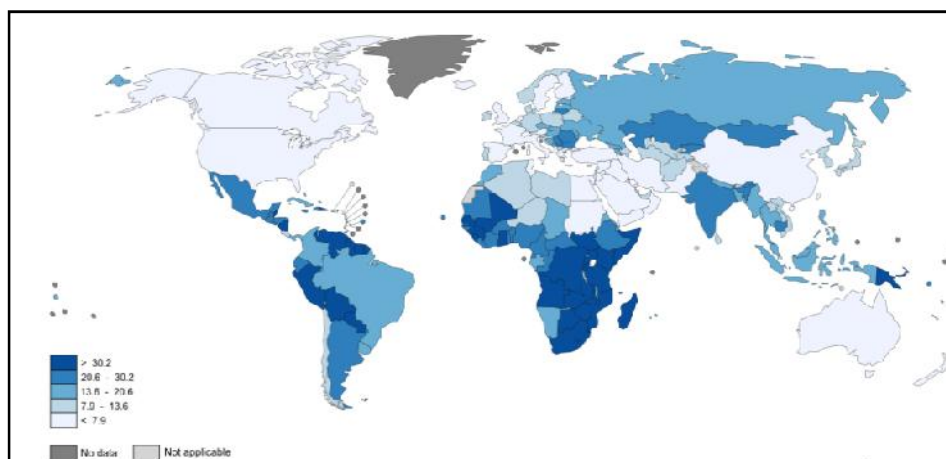


Figura 7. Incidencia por Cáncer Cervicouterino en el mundo en el año de 2012. La intensidad de color representa la alta incidencia de esta patología. Tasa estandarizada por cada 100,000 mujeres¹².

Esta patología se desarrolla de una manera lentamente, antes de que se encuentra la presencia de algún tipo de células cancerígenas en el cuello de útero, sus tejidos comienzan a experimentar algunos cambios con el comienzo de aparición de células anormales, éstas inician con el crecimiento y diseminación

con una mayor precisión y profundidad en el cuello del útero y en las áreas circundantes causando algún tipo de NIC que posteriormente evoluciona a CaCu, cambios causados por algún tipo de IVPH de alto riesgo³⁷.

El CaCu es una enfermedad prevenible y para ello las mujeres deben adherirse a conductas estrechamente relacionadas con la detección oportuna de lesiones causadas por la IVPH, ya que es considerado el principal agente causal en el desarrollo de esta patología³⁸.

3.5 AGENTE CAUSAL: VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

En la década de los ochenta se identificó a la IVPH como una causa necesaria pero no suficiente para el desarrollo de la enfermedad, ya que necesita la presencia de diferentes co-factores que ayuden al progreso la IVPH a convertirse en NIC y su posterior progreso hacia CaCu^{18,19}.

Actualmente se han identificado más de 200 genotipos de VPH, aunque se ha reportado que son 40 aproximadamente los que infectan el tracto ano-genital, sin embargo, los tipos más frecuentes asociados a tumores malignos del cuello uterino son los genotipos -16, -18 y -45. Los tipos virales también dependen de la región geográfica; un ejemplo de ello son los genotipos -31 y 33 que prevalecen más en regiones de Europa y EUA; en África los más frecuentes son los genotipos -35 y -45; y en Asia se reportan los genotipos -52 y -58; finalmente en México los genotipos más frecuentes de VPH son -16, -18, -31, -45³⁹.

Este virus pertenece a la familia *Papovaviridae* y es un organismo no envuelto que mide aproximadamente 55 nm de diámetro. Contienen un único genoma de ADN circular bicatenario, cerrado, que contiene alrededor de 8,000 pares de bases. Los virus tienen una cápside icosaédrica (cubierta de proteína) compuesta de una proteína principal, LI (aproximadamente 90 por ciento de la

proteína de la cápside) y una proteína menor, L2 que la protege y tres regiones génicas²⁹:

- a) la región codificante tardía (*late región* "L") involucrada en la expresión de proteínas de la cápside que se requieren para el ensamblaje viral; se divide en L1 y L2;
- b) la región temprana (*early región* "E") que codifica proteínas que juegan un rol importante para la replicación y la transformación (oncogenicidad); E6 y E7 son las más importantes;
- c) la región reguladora no codificante (*upstream regulatory región* "URR" o también conocida como *long control región* "LCR") que regula la transcripción de las proteínas tempranas⁴⁰.

Una vez que las células son infectadas por VPH comienza la replicación del virus gracias a factores de transcripción de la célula hospedera y la proteína E1 viral. E7 se une a la proteína retinoblastoma dejando libre al factor de transcripción E2F, lo que permite la activación de genes que aumentan la proliferación celular.

La oncoproteína E6 es capaz de inducir la ubiquitinización y posterior degradación de p53, lo que conlleva a disminución de la apoptosis mediada por p53. E2 regula la transcripción de las oncoproteínas E6 y E7.

La proteína E5 aumenta la acción de las kinasas celulares lo cual promueve la proliferación y disminuye la diferenciación celular. E4 ayuda al ensamblaje de las proteínas de la cápside viral L1 y L2 para el empaquetamiento de los viriones de VPH (figura 8)¹⁷.

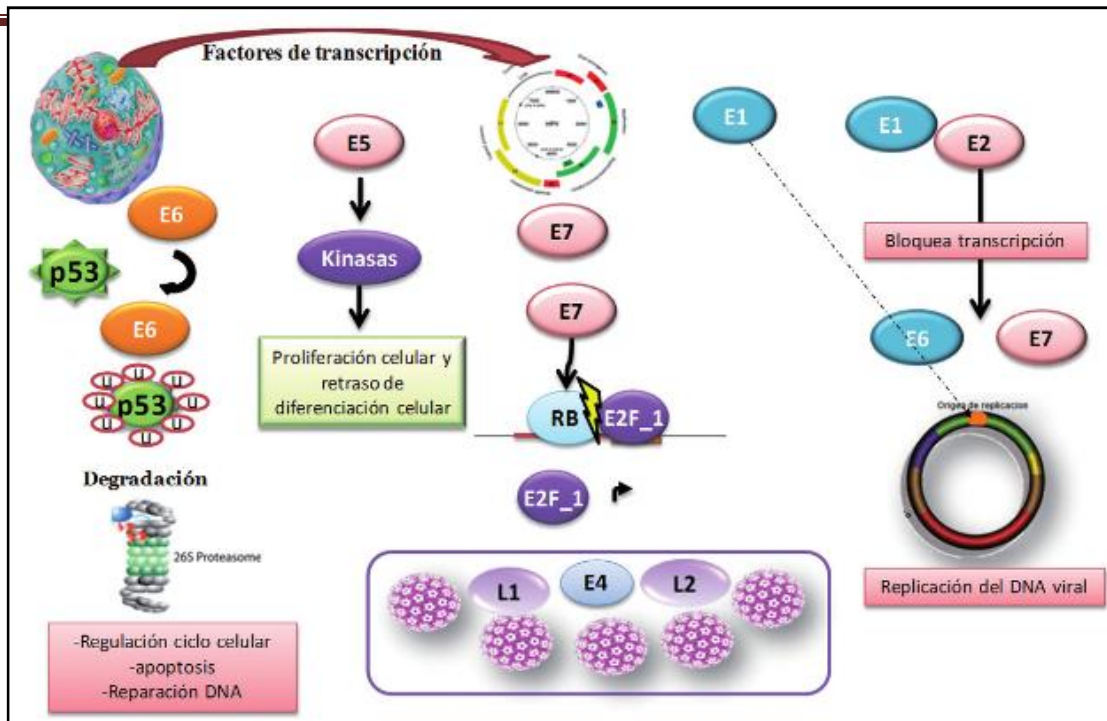


Figura 8. Patogenicidad del virus del papiloma humano¹⁷.

Cuando el VPH se inserta en el epitelio del cérvix, tiene la capacidad de infectar a las células del mismo a tal grado de transformarlas dando como resultado cambios morfológicos de éstas, llamándose así células coilocíticas. La características de los coilocitos es que se observa en ellas hiper cromasia nuclear, binucleación, irregularidad de membrana nuclear, halo claro perinuclear que desplaza el citoplasma a la periferia en las células escamosas del epitelio cervical (figura 9)²⁹.

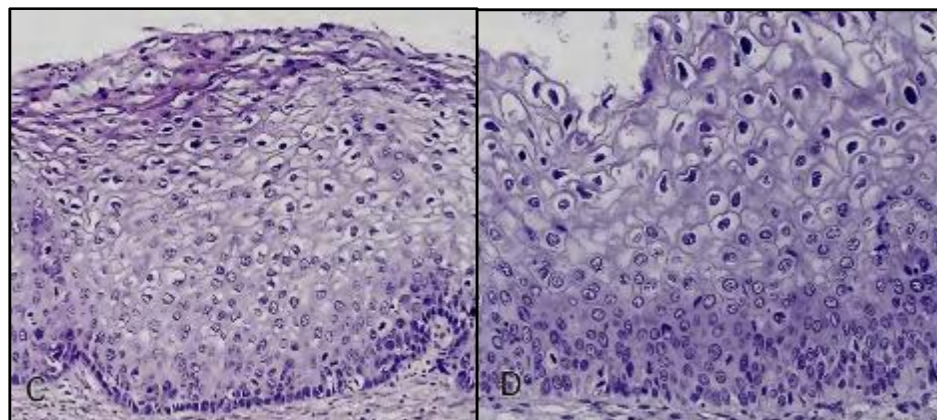


Figura 9. Lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado²⁹.

3.6 NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL

El carcinoma *in situ* se reconoce como el precursor del cáncer invasor, la mayor parte de los precánceres cervicales, así como los cánceres invasivos muestran una diferenciación escamosa. Es por eso que el sistema de clasificación por lesiones cervicales se desarrolló para así abarcar todas las posibles lesiones escamosas precancerosas y clasificar las lesiones en los grados de NIC I, NIC II Y NIC III.

El sistema es descriptivo, los cambios morfológicos se consideran como un continuo, y los tres grados se definen por criterios arbitrarios, el más importante de los cuales es la proporción del epitelio ocupada por células indiferenciadas de tipo basal. El uso del sistema NIC está profundamente arraigado en la práctica clínica y proporciona un nivel de continuidad en la terminología para los registros de diagnóstico⁴¹.

Las alteraciones uterinas van desde una lesión intraepitelial en el cuello del utero y esta varía desde un aumento anormal mínimo (bajo grado) hasta la evolución en el espesor que llega a la capa más superficial del epitelio (considerada de alto grado)⁴²

Los cambios displásicos son evolutivos y de acuerdo a su magnitud en el momento del estudio, es que las displasias se clasifican. En el cuadro 1 se muestran las diferentes nomenclaturas que se les da a los tipos de lesiones desde el punto de vista citológico⁴³.

Para México según la norma 014, los resultados histopatológicos deben ser informados de la siguiente manera:

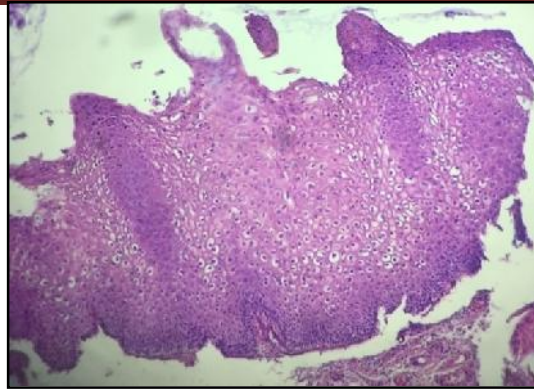
- lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (VPH, NIC 1 o displasia leve);
- lesión intraepitelial escamosa de alto grado (NIC 2 o displasia moderada, NIC 3 o displasia grave y cáncer in situ);

- carcinoma epidermoide microinvasor;
- carcinoma epidermoide invasor²⁸.

| | | | | | | |
|--------------------|----------------------|------------------|-------------------|-----------------------------------|--------------------|---------------|
| Bethesda (2001) | Neg. A malignidad | Cambio Repara | | Lesión intraepitelal escamosa | | CA invasor |
| | | | ASCUS AS-HOGC | LIEBG (VPH) | | |
| Richart (1993) | Normal | Inflamación | | Neoplasia intrepeitelial cervical | | |
| | | | NIC I | NIC II | NIC III | |
| OMS (1979) | Normal | Inflamación | Displasia leve | Displasia moderada | Displasia grave | CA insitu |
| PAP (1972) | CLASE I | CLASE II | CLASE III | | CLASE IV | CLASE V |

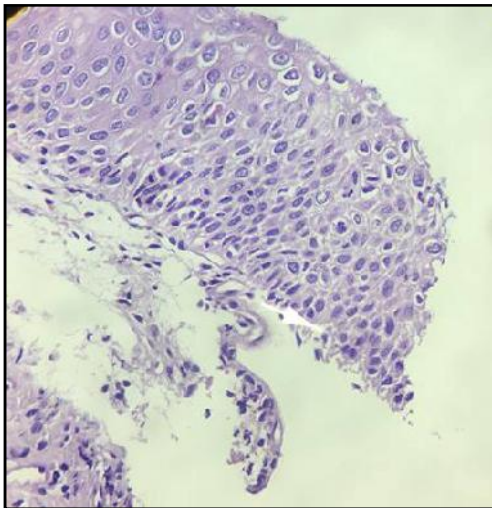
Cuadro 1. Clasificación citológica de lesiones cervicales²⁹.

Los cambios epiteliales cervicales incluidos en el término NIC se inician con la displasia leve grado I (NIC I), en esta etapa la atipia celular es mínima y afecta el tercio o cuarto inferior del epitelio. Estos cambios pueden observarse en el epitelio cervical habitual o en el epitelio aplanado notable por cambios coilocitóticos (condiloma plano). La coilocitosis constituye una angulación nuclear rodeada por vacuolización perinuclear producida por un efecto viral citopático, en este caso la IVPH (figura 10)⁴⁴.

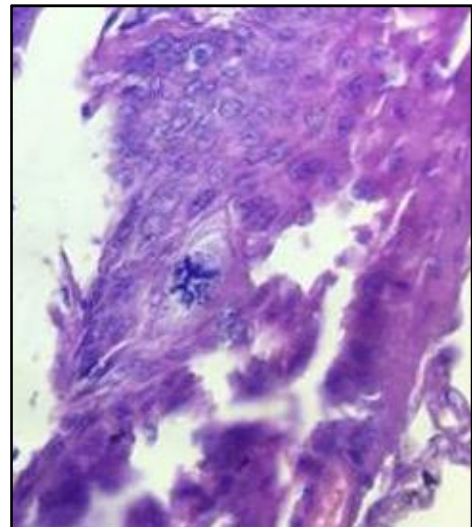


**Figura 10. Lesión intraepitelial escamosa cervical de bajo grado por IVPH (NIC I).
Microfotografía de campo claro 10x. Fuente directa**

Con el avance a NIC II la displasia se hace más grave y afecta a la mitad inferior del epitelio, se acompaña de cierta variación en el tamaño de la célula y del núcleo y con mitosis de apariencia normal por arriba de la capa basal, estos cambios se designan displasia moderada, la capa superficial de las células aún está bien diferenciada, pero ciertos casos muestran los cambios coilocitóticos descritos (figura 11), además de la característica que se puede encontrar mitosis atípica en la segunda parte del epitelio, a pesar de que no se encuentren células neoplásicas, lo que aún así se podría considerar una lesión de alto grado (NICII) (figura 12)⁴⁵.



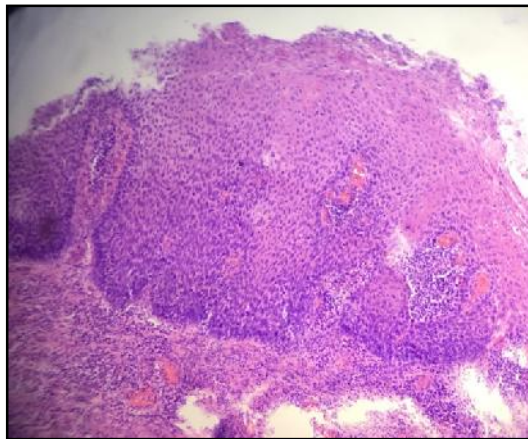
**Figura 11. Lesión intraepitelial escamosa cervical de alto grado por IVPH (NIC II).
Microfotografía de campo claro 40x.
Fuente directa**



**Figura 12. Mitosis atípica
Microfotografía de campo claro 40x.
Fuente directa**

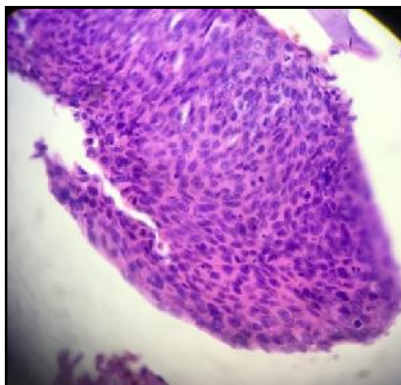
3.7 CÁNCER CERVICOUTERINO

El siguiente caso es la displasia grave (NIC III), notable por la mayor variación en la dimensión de la célula y del núcleo, ubicación desordenada de las células y mitosis normales o anormales, estos cambios afectan casi todas las capas del epitelio, la diferenciación de las células de la superficie y los cambios coilocitóticos por lo general han desaparecido. En la ilustración 7 y 8 se muestran los distintos tipos de neoplasias (figura 13)⁴⁶.



**Figura 13. . Lesión intraepitelial escamosa cervical de alto grado por IVPH (NIC III).
Microfotografía de campo claro 40x. Fuente directa**

Cuando se considera cáncer *in situ*, se observa proliferación y atipia con pérdida de la maduración, hiper cromasia nuclear, mitosis atípicas, pérdida de la relación núcleo citoplasma que afecta el epitelio escamoso del cérvix en todo su espesor (figura 14)²⁹.



**Figura 14. Lesión intraepitelial escamosa cervical de alto grado por IVPH
(Carcinoma in situ).
Microfotografía de campo claro 40x. Fuente directa**

Finalmente cuando las células neoplásicas rompen la membrana basal y estas entran al estroma se le llama carcinoma micro invasor en una profundidad menor de 5mm y un diámetro menor a los 7 mm (figura 15); cuando el espesor de esta supera una profundidad de 5 mm y 7 mm el diámetro es considerado carcinoma invasor(figura 16) además de que también se caracteriza por que se observan perlas corneas (figura 17)^{29,47}.

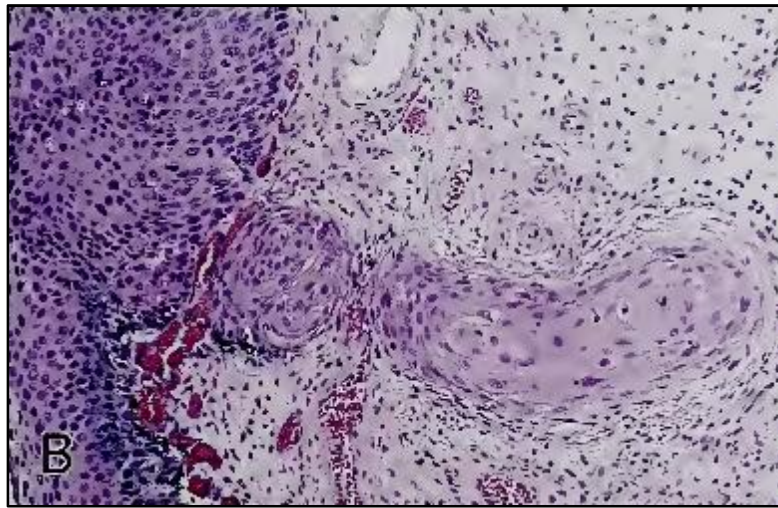


Figura 15. Carcinoma micro invasor²⁹.

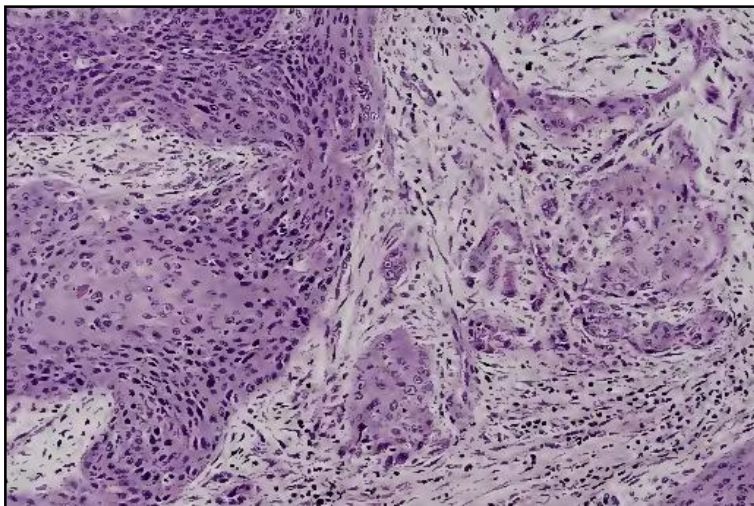
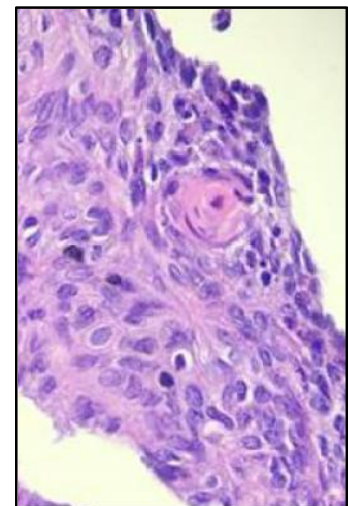


Figura 16. Carcinoma invasor²⁹.



**Figura 17. Perla cornea.
Microfotografía de campo claro 40x.
Fuente directa**

3.8 METODOS DE TAMIZAJE

La impresión de sospecha de lesión escamosa intraepitelial o de los cánceres cervicales y detectarlos de manera oportuna se puede establecer por diferentes métodos diagnósticos, detección o pruebas de tamizaje, como la citología y la inspección visual a través de la colposcopia del cuello uterino con ácido acético, que da como resultado una impresión diagnóstica que amerita una biopsia y su debido informe histológico que es en definitiva es el diagnóstico definitivo. Para esto la SEGO (*Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia*) en su guía práctica clínica muestra el algoritmo del diagnóstico de cáncer de cuello uterino (figura 18)^{48,49}.

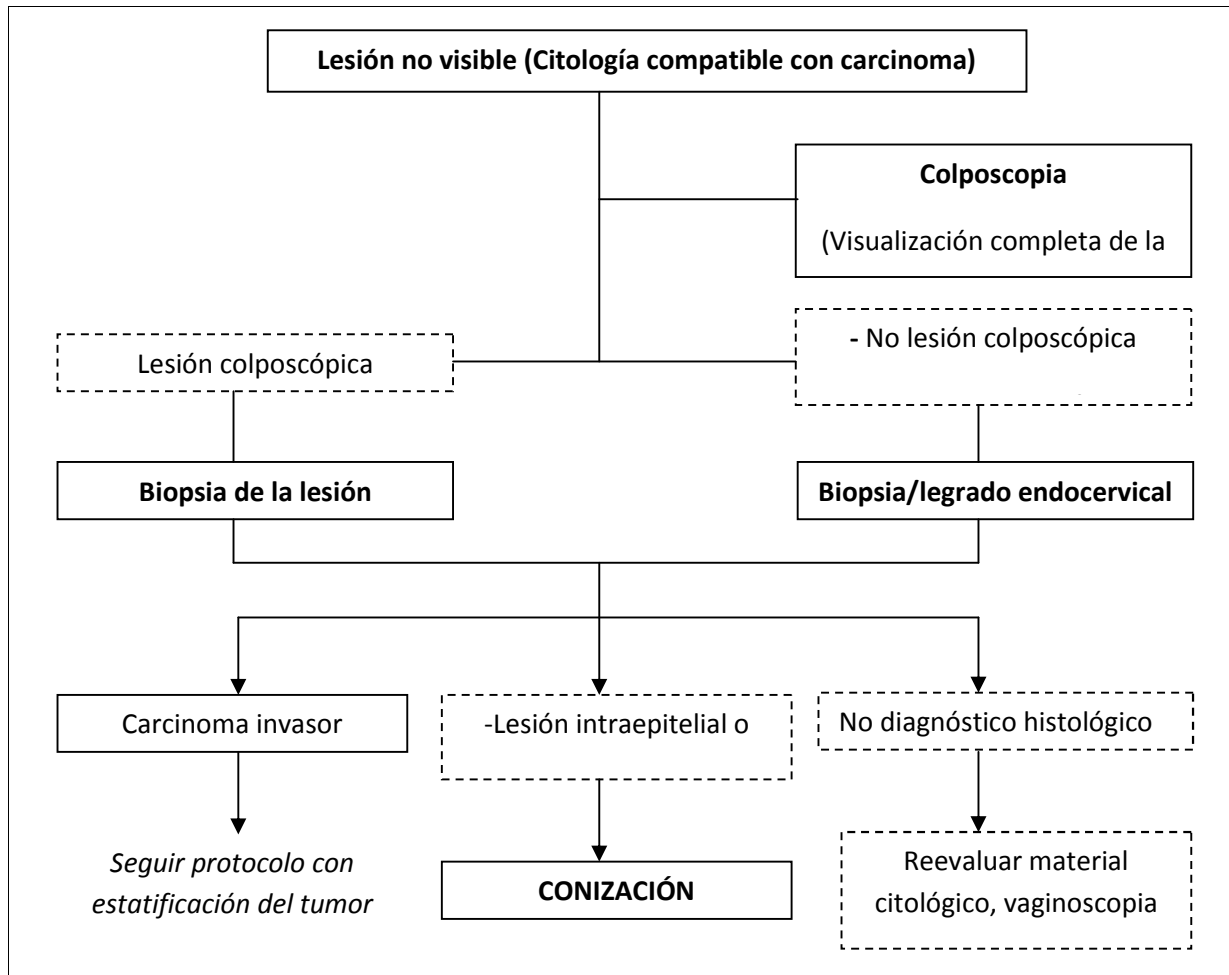


Figura 18. Diagnóstico de lesión no visible macroscópicamente⁵⁰.

3.8.1. Estudio histopatológico

La histopatología es el estudio microscópico del tejido enfermo, es una herramienta médica de investigación importante que se basa en el estudio de la histología humana o animal (también llamada anatomía microscópica). Se realiza al examinar una sección delgada de tejido bajo microscopios de luz⁵¹.

Es el estudio que da una precisión diagnóstica más sensible, considerado como el “gold standard” para dar una certeza y a cualquier tipo de tratamiento. En cualquier alteración en las pruebas citológicas y colposcópicas con alteraciones mayores, se refiere a la realización de la toma de una biopsia para verificar la certeza de cualquier lesión preinvasora. La toma de más de una biopsia precisa una mayor certeza diagnóstica. En lesiones extensas, se debe considerar la realización del denominado “Mapeo Biopsico” (varias tomas pequeñas)⁵⁰.

La técnica histológica consiste en una serie de procedimientos que permiten visualizar las características microscópicas de los tejidos y las células y reconocer los cambios estructurales microscópicos específicos de las enfermedades.

Rutinariamente, los tejidos se fijan con formalina neutra al 10%, se mordieron en parafina y luego se seccionaron manualmente con un microtomo para obtener secciones de parafinas de 4-5 um de espesor. Las secciones desparafinadas se tiñen luego con hematoxilina y eosina (H & E) o se pueden usar para otros fines (tinciones especiales, inmunohistoquímica, hibridación in situ, etc.). Durante este proceso, muchos pasos y procedimientos son fundamentales para garantizar secciones estándar e interpretables.

La evaluación histopatológica básicamente compara los tejidos enfermos o alterados experimentalmente con muestras coincidentes de contrapartes sanas o de control. Por lo tanto, es muy importante estandarizar rigurosamente cada proceso de histología (es decir, muestreo de muestra, recorte, incrustación, corte y tinción⁵¹).

En una investigación de 2011 refieren la técnica correcta de el procesamiento de las muestras (biopsias), de inclusión, seccionamiento y tinción de las mismas, sin embargo no refiere cuántos niveles o cortes de este se requieren para una mayor precisión diagnóstica⁵¹.

Estudios publicados actualmente muestran que ante la sospecha de una enfermedad invasiva con base a las características citológicas, colposcópicas o histológicas, debe examinarse 1 o preferiblemente 2 cortes más en el bloque de parafina para establecer el diagnóstico histopatológico¹¹. En otro estudio publicado en 2007 se menciona que se requieren al menos 5 cortes en el bloque de parafina (a priori o en recuts) para asegurar una precisión diagnóstica del 100% en los grados de NIC II Y NIC III¹⁰.

Por otro lado la guía del Tissue pathways for gynaecological pathology del The Royal College of Pathologic, en su última actualización del año de 2015, sugiere solo hacer 3 cortes en el bloque de parafina al momento del corte de la biopsia¹³. Los estudios anteriormente mencionados muestran la importancia y la necesidad de conocer más acerca del número de cortes que se deben realizar para obtener un diagnóstico más sensible.

3.8.2 Técnicas moleculares para la detección de VPH

Actualmente se cuentan diferentes pruebas moleculares y diversas metodologías que ya se encuentran estandarizadas y certificadas para su uso diagnóstico que detectan y en ciertos casos tipificar diferentes tipos de VPH de alto riesgo, ya sea, captura de híbridos y la reacción en cadena de polimerasa. La PCR se ha desarrollado utilizando diferentes primers iniciadores consenso con sensibilidad variable y debe estar acompañada de otra técnica de análisis que permita identificar la tipificación del virus, por ejemplo, la hibridación con sondas tipo-específicas, análisis de secuencia o de restricción. Esta técnica es un método molecular específico y sensible, que es capaz de detectar entre 10 y 200 copias de un genoma viral por muestra, aunque es un método laborioso y relativamente

con un alto costo comparado con los diagnósticos convencionales. La PCR fue desarrollada para diagnosticar y tipificar más de 30 tipos de diferentes VPH en muestras que se toman del área genital^{52,53}.

3.8.3 Carga viral del DNA del VPH

La carga viral de VPH es un indicador de riesgo en el desarrollo de CaCu y progresión de otros cánceres que tengan algún tipo de infección por VPH. La carga viral significativamente más alta de IVPH puede ser conocida a través de la PCR tiempo real, esta se detecta en mujeres con alguna lesión cervical de alto grado y puede existir un descenso de la misma tras la extracción quirúrgica de la lesión, es por eso que se sugiere que la carga viral de la IVPH puede llegar a utilizarse como un indicador de la probable aparición de algún tipo de NIC de alto grado⁵⁴.

La determinación de la carga viral está adquiriendo mayor importancia clínica debido a que las terapias encaminadas a la eliminación de las lesiones provocadas por IVPH están asociadas con las altas tasas de recurrencia, se cree que esto se debe a una reducción de la carga viral y a la estimulación de la inmunidad local gracias a los antígenos virales, permitiendo una inmunidad celular para todo el VPH residual. De esta manera la cuantificación de la carga viral está permitiendo visualizar la efectividad de los tratamientos y así desarrollar antivirales más efectivos⁵⁵.

IV. HIPÓTESIS

H1: La examinación a 3 niveles más en el bloque de parafina de biopsia influye en la variación del diagnóstico histopatológico de los diferentes grados de NIC, IVPH y CaCu.

H0: La examinación a 3 niveles más en el bloque de parafina de biopsia no influye en la variación del diagnóstico histopatológico de los diferentes grados de NIC, IVPH y CaCu.

V. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Determinar la variación del diagnóstico histopatológico al examinar 3 niveles más en el bloque de parafina de biopsia de los diferentes grados de NIC, IVPH y CaCu.

5.2 ESPECÍFICOS

- Comparar el diagnóstico histopatológico inicial, con respecto a los obtenidos con la examinación a 3 niveles más en los bloques de parafina de biopsias de los diferentes grados de NIC, IVPH y CaCu.
- Identificar la carga viral del ADN del VPH en los diferentes grados de NIC y CaCu por PCR tiempo real.
- Establecer la concordancia del diagnóstico histopatológico con 3 niveles más del bloque de parafina con respecto al diagnóstico por PCR tiempo real como un estándar de oro.

VI. METODOLOGÍA

6.1 TIPO DE ESTUDIO

Cuantitativo, correlacional

6.2 DISEÑO METODOLÓGICO

Estudio longitudinal, retrospectivo.

6.3 LÍMITES DE TIEMPO Y ESPACIO

El estudio se realizó en el servicio de patología del Hospital General del Soledad en el estado de San Luis Potosí. El tiempo de recolección de las muestras (bloques de parafina) fue en el periodo de Septiembre de 2017 a Febrero de 2018.

6.4 UNIVERSO

Muestras (bloques de parafina de tejido de cérvix) de mujeres del servicio de patología del hospital de segundo nivel de atención en salud.

6.5 MUESTRA Y TIPO DE MUESTREO

El tamaño de la muestra fue de 150 bloques de parafina de biopsia de cérvix de diferentes pacientes cada uno, el muestreo fue no probabilístico y estratificado como se observa en el cuadro 2.

| TIPO DE LESIÓN | NÚMERO |
|----------------|------------|
| IVPH | 32 |
| NIC I | 31 |
| NIC II | 30 |
| NIC III | 29 |
| CACU | 30 |
| Total | 152 |

Cuadro 2. Estratificación de la muestra por distintos grados de NIC, IVPH y CaCu.

6.6 CRITERIOS DE ESTUDIO

6.6.1 De inclusión

Muestras (bloques de parafina de biopsia) de pacientes con algún grado de NIC, IVPH y CaCu.

6.6.2 De exclusión

Muestras de pacientes del 2014 hacia años adelante.

6.6.3 De eliminación

Bloques de conización con algún grado de NIC IVPH y CaCu.

6.7 VARIABLES

6.7.1 Variable independiente

Diagnóstico histopatológico.

6.7.2 Variable dependiente

Presencia de los diferentes grados de NIC, IVPH y CaCu por los 3 diferentes niveles y carga viral.

6.7.3 Operacionalización de las variables

Las operacionalización de las variables se encuentran en el anexo 1.

6.8 PROCEDIMIENTOS

6.8.1 Recolección de muestras

El protocolo fue autorizado por el comité de la Maestría en Salud Pública (Anexo 2) posteriormente se sometió al Comité de Ética de Investigación de la Facultad de Enfermería y Nutrición, el cual fue aprobado con el número de registro: CEIFE-

2017-211 (Anexo 3). Finalmente se sometió al Comité de Ética e Investigación del Hospital General de Soledad y fue aprobado con el número de registro: CEI-HGS-001-20 (Anexo 4). Se trabajó con muestras de 2014; se registró el diagnóstico inicial de cada una de las muestras, realizados por la institución de origen para su posterior comparación.

6.8.2 Técnica Histológica

6.8.2.1 Corte

Para los siguientes cortes realizados para esta investigación el bloque se insertó en el brazo del micrótopo (Leica Biosystems, RM-2125-RTS, Germany) y se colocó la cuchilla (Accu-Edge, Low profile microtome blades, Japón) en su soporte en el ángulo adecuado (de 5 a 7°). A partir del primer y único corte realizado por la institución, se realizó un desbaste al bloque de parafina de biopsia de cérvix de 50 micras, por consiguiente un corte a un grosor de 5 micras, posteriormente se hizo lo mismo en 2 niveles más (figura 19).

Las tiras de cortes sobre la cuchilla se separaron sobre una superficie oscura usando una lanceta y una cuchilla. Los cortes se estiraron ya que estos salen del micrótopo arrugados. Para ello se colocó los cortes uno a uno en baño de agua destilada (Premiere, Tissue floating bath, XH-1001, USA) a 45°C, 5° por abajo del punto de fusión de la parafina.

Los portaobjetos se sumergieron en el baño de estiramiento, se colocaron sobre ellos los cortes y se introdujeron en una cámara de calor y secado (Binder, ED-115, Germany) a 65°C, para derretir la parafina. Los portaobjetos comenzaron con el protocolo de tinción elegido para la muestra; la técnica de tinción que se utilizó fue la de Hematoxilina-Eosina (Merck KGaA, 1050175, Germany)(Hycel, 686, México) y posteriormente se visualizaron en el microscopio de doble cabezal (Leica Biosystems, DM-750, EUA) a 10 x y 40x.

Las lecturas de las laminillas fueron realizadas simultáneamente por un primer médico especialista en patología (primer estándar de oro), junto con el autor de este estudio con previa capacitación para realizar el diagnóstico histopatológico utilizando un microscopio de doble cabezal; las laminillas se escogieron al azar cegando el diagnóstico inicial y posteriormente una de cada 10 laminillas elegidas al azar, fueron leídas por un segundo médico especialista en patología, para dar validez de la lectura como segundo estándar de oro.

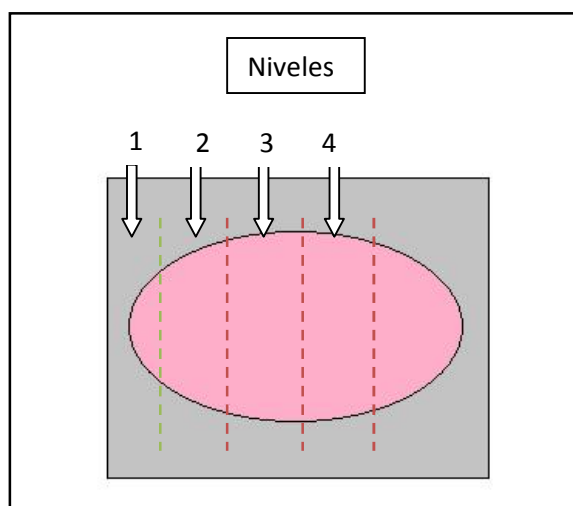


Figura 19. Corte del bloque de parafina a diferentes niveles.

El cuadro gris representa al bloque de parafina, el ovalo rosa la biopsia cervical; la primera línea punteada indica el corte (verde) al primer nivel por la institución y los tres siguientes realizados en esta investigación (rojo).

6.8.3 Técnica de obtención de tejido de cérvix a partir del bloque de parafina.

Se cortaron 5 rollos de 10 micras tomados del desbaste del bloque de parafina con biopsia de cérvix entre cada nivel, por cada bloque de parafina, estos rollos con tejido fueron colocados en un tubo ependorf estéril. Previamente, entre cada muestra y por cada corte de nivel se limpiaba la cuchilla y alrededor de la misma con isopropanol (Sigma-aldrich, 2-propanol, USA) para así evitar contaminación.

6.8.4 Técnica para desparafinar tejido de cérvix a partir del bloque de parafina

A los rollos de parafina con tejido de cérvix se les agregaron 1,000 uL de xileno (Jalmek, México), se agitó vigorosamente al vórtex (Scientific Industries, Vortex-2-genie, USA) hasta que la parafina se volvió transparente o hasta que esta se degradara por completo. La mezcla se centrifugó (Hermle Labortechnik, GMBH, Germany) a 13,000-16,000 x *g* por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y al precipitado se agregaron 1,000 uL de etanol al 100% (grado biología molecular) (Sigma, etanol absolute grade, USA), se agitó vigorosamente al vórtex y se centrifugó a 13,000-16,000 x *g* por 5 minutos, se retiró el sobre nadante y se repitió este proceso nuevamente, quedando al final una pastilla de tejido de cérvix.

6.8.5 Técnica de extracción de ADN a partir de tejido de biopsia de cérvix

Se utilizó el Kit comercial (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, PROMEGA) para la extracción del ADN y todo este proceso se trabajó bajo campana de flujo laminar (CHC Lab, CLB-060F-04, Korea).

Al tubo con la pastilla de tejido de cérvix se le agregaron 180 uL de buffer de lisis y 20 uL de proteinasa K (Thermo scientific), se colocó en un termomix (Sigma, Eppendorf-Thermomixer F1.5, Germany) incubandolo a 56°C por 24 horas. Posteriormente se le agregaron 200 uL de solución de precipitación de proteína, se agitó vigorosamente al vórtex por veinte segundos, se incubó a -20°C por 5 minutos y se centrifugó por 13,000-16,000 x *g* por 4 minutos, para así generar un pellet que fue proteína precipitada.

Se retiró cuidadosamente el sobrenadante que contenía el ADN del tejido de cérvix, pasándolo a un tubo ependorf nuevo de 1.5 uL el cual ya tenía 600 uL de isopropanol a temperatura ambiente, posteriormente se mezcló por inversión y se centrifugó a 16,000 x *g* por 1 minuto a temperatura ambiente, del cual se obtuvo un pellet de DNA.

Cuidadosamente se retiró el sobrenadante, para posteriormente agregar 600 uL de etanol al 70% a temperatura ambiente y se mezcló suavemente la solución por inmersión, el tubo se centrifugó por 1 minuto a 16,000 x g a temperatura ambiente, del cual se generó un pellet de DNA, se decantó el sobrenadante y el tubo se invirtió en una sanita para secar el etanol por 10-15 minutos aproximadamente.

Finalmente se agregaron 100 uL de solución de rehidratación y se incubó a 65°C por una hora durante la cual el tubo se mezcló por inmersión periódicamente, se incubó el tubo por toda la noche a 4°C y se guardó este a -20°C hasta su uso.

6.8.6 Cuantificación, integridad y pureza del ADN

La cuantificación e integridad del ADN se realizó por espectrofotometría, colocando 1 uL del genómico de las muestras de los cortes de parafina en el 2000c NanoDrop UV-Vis (Thermo Fisher Scientific), se realizó una lectura de absorbancia a 260 nm, la cual permitió calcular la concentración de ácidos nucleicos en una muestra. Una OD de 1 corresponde aproximadamente a 50 ug/ml de doble cadena de ADN. La relación entre las lecturas a 260nm y 280nm (OD 260/OD 280 de absorbancia) provee un estimado de la pureza de los ácidos nucleicos. Las preparaciones puras de ADN tienen valores de entre 1.6 a 1.9.

6.8.7 Genotipificación con PCR tiempo real con SYBR Green

De los diagnósticos histopatológicos que coincidieron con el diagnóstico inicial a la lectura de las laminillas, se tomó el DNA extraído de estas muestras y se tipificó el RNA mensajero de 3 tipos virales de alto riesgo más comunes: EVPH-16, EVPH18, EVPH-31 y EVPH-33 (cuadro 3).

Cuadro 3. Secuencias de oligos para RNA mensajeros de EVPH-16, EVPH-18, EVPH-31, EVPH-33.

| Oligo | Longitud | Secuencia (5'->3') |
|-----------------------|----------|---------------------------|
| E6-VPH-16 (SENSE) | 20 bp | AATGTTTCAGGACCCACAGG |
| E6-VPH-16 (ANTISENSE) | 22 bp | GTTGCTTG CAGTACACACATTC |
| E6-VPH-18 (SENSE) | 21 bp | ACCCTACAAGCTACCTGATCT |
| E6-VPH-18 (ANTISENSE) | 24 bp | ACCTCTGTAAGTTCCAATACTGTC |
| E6-VPH-31 (SENSE) | 21 bp | CTGACCTTTGCAGTAGACACA |
| E6-VPH-31 (ANSISENSE) | 20 bp | CTGCAGAAAGACCTCGGAAA |
| E6-VPH-33 (SENSE) | 24 bp | GCATTGGAGACA ACTATACACAAC |
| E6-VPH-33 (ANTISENSE) | 20 bp | TTCCAAATGGATTTCCCTCTCT |

Se trabajó en placas de 96 pozos (Thermo Fisher Scientific), en las cuales se colocaron: 7 picomoles/microlitro del oligo sense, 5 picomoles/microlitro del oligo antisense, 5 microlitros de SYBR Green (Real-time PCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific), 50 nanogramos/microlitro de DNA extraído de las muestras y se ajustó a 10 uL de volumen final con H₂O estéril y un NTC (control negativo).

Se colocó la placa en el equipo de qPCR tiempo real (StepOne Real-Time PCR System, Thermo Fisher Scientific) y se programó a las siguientes condiciones (cuadro 4). La estandarización de esta técnica se encuentra en el anexo 5.

Cuadro 4. Condiciones para amplificación para EVPH-16, EVPH18 y EVPH-31.

| Programa de amplificación | | |
|---------------------------|-------------|-----------|
| Temperatura | Tiempo | Ciclos |
| 95°C | 10 minutos | 1 ciclo |
| 95°C | 15 segundos | 40 ciclos |
| 60°C | 1 minuto | |
| 95°C | 15 segundos | |
| 60°C | 1 minuto | |
| 95°C | 15 segundos | |

6.8.9 Cuantificación de carga viral y genotipificación a través de PCR tiempo real

Para los diagnósticos histopatológicos que no coincidieron con el inicial a la lectura de las laminillas (53 muestras) se realizó la cuantificación y genotipificación viral a través de qPCR la cual se hizo por un kit comercial (Amplisense HPV HCR types Real Time PCR kit) el cual amplificó 7 genotipos de alto riesgo de IVPH, simultáneamente un fragmento del gen humano de β -globina como control interno de la integridad y calidad tanto del ADN como de la reacción de PCR, junto con dos controles positivos y uno negativo (cuadro 5).

Cuadro 5. Genotipos de VPH de alto riesgo que se amplificaron.

| Tipos de VPH |
|---------------------|
| 16, 18, 31/Glob |
| 39, 45, 59/Glob |
| 33, 35, 56, 68/Glob |
| 51,52,58,66/Glob |

Se trabajó con placas de 96 pozos (Thermo Fisher Scientific), e cada pozo se colocaron: 10 uL de PCR buffer B/taq Mix, 5 uL de PCR Mix-FL-HPV (cada tipo viral) y 10 uL de DNA ajustado a 20 ng/microlitro; se colocó dos controles positivos (C1 y C2) y un control negativo.

La placa se colocó en el Piko Real Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific), bajo las condiciones especificadas en el cuadro 6.

Cuadro 6. Condiciones de amplificación para qPCR.

| Programa de amplificación | | |
|---------------------------|-------------|--------|
| Instrumento de placas | | |
| Temperatura °C | Tiempo | Ciclos |
| 95 | 15 minutos | 1 |
| 95 | 5 segundos | 5 |
| 60 | 20 segundos | |
| 72 | 15 segundos | |
| 95 | 5 segundos | 40 |
| 60 | 30 segundos | |
| 72 | 15 segundos | |

6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

6.9.1 Análisis de los datos de qPCR tiempo real

El cálculo y análisis de resultados de la qPCR tiempo real se llevó a cabo automáticamente con el uso de software AmpliSens® HPV HCR genotipo-titre en formato Microsoft® Excel, a través del cual se tipificaron los genotipos de la IVPH de alto riesgo y la carga viral de los mismos.

El análisis del resultado se realizó mediante el software del instrumento de PCR en tiempo real utilizado al medir la acumulación de señal de fluorescencia en cuatro canales:

- La señal de los genotipos del HPV 16, 39, 33 y 58 del producto de amplificación del ADN se detectó en el canal para el fluoróforo FAM.
- La señal de los genotipos de HPV 31, 45, 35 y 52 del producto de amplificación de ADN se detectó en el canal para el fluoróforo JOE.
- La señal de los genotipos de VPH 18, 59, 68 y 66 del producto de amplificación de ADN se detectó en el canal para el fluoróforo ROX.

- La señal de los genotipos HPV 56 y 51 del producto de amplificación de ADN se detectó en el canal para el fluoróforo Cy5.
- La señal del producto de amplificación de control interno endógeno (fragmento del gen de la globina) se detectó en el canal para la fluorescencia Cy5 (cuadro 7).

Cuadro 7. Canales para detectar los diferentes genotipos virales.

| Matrix for comparison | | | |
|-----------------------|-----|-----|-----|
| FAM | JOE | ROX | Cy5 |
| 16 | 31 | 18 | IC |
| 39 | 45 | 59 | IC |
| 33 | 35 | 68 | 56 |
| 58 | 52 | 66 | 51 |

Los resultados se interpretaron cruzando (o no cruzando) la curva de fluorescencia con la línea umbral establecida en el nivel específico que corresponde a la presencia (o ausencia) de un valor de Ct de la muestra de ADN en la columna correspondiente de la cuadrícula de los resultados.

La curva de calibración se trazó automáticamente sobre la base de los valores Ct del umbral y los valores de los calibradores conocidos, y se calcularon las concentraciones (copias) de ADN humano y cada genotipo detectado de ADN del VPH. Los valores obtenidos se utilizaron para calcular la cantidad de ADN del VPH de 100.000 a 1×10^6 células humanas.

6.9.2 Análisis estadístico

Se realizó una estadística descriptiva e inferencial. Se utilizó la prueba estadística Chi-cuadrada con un IC del 95% para la diferencia de proporciones entre los

diagnósticos iniciales de la institución y los diagnósticos que se obtuvieron a la examinación a los diferentes niveles del bloque de parafina.

Se utilizó la prueba estadística de Coeficiente de Kappa con un IC del 95% para la correlación de proporciones del diagnóstico del primer patólogo con el diagnóstico del segundo patólogo.

Se utilizó la prueba estadística de Spearman con un IC del 95% para la correlación entre el diagnóstico histopatológico y la carga viral.

6.10 RECURSOS

6.10.1 Recursos humanos

El equipo de trabajo se conformó por la Dra. Luz Eugenia Alcantara Quintana, Lic. Enf. Edgar Villegas Hinojosa, Dra. Verónica Gallegos García, Dra. Yolanda Terán Figueroa, la Dra. Anahíd Elizabeth Campuzano Barajas y el Dr. Cuauhtémoc Oros Ovalle.

6.10.2 Recursos Financieros

El laboratorio de bioquímica y nutrición de la Facultad de Enfermería y Nutrición de la UASLP, cuenta con el equipo necesario para el desarrollo del proyecto; para el apoyo de los insumos y reactivos se cuenta con el financiamiento del “Fortalecimiento de los cuerpos académicos convocatoria 2012”; también se cuenta con el financiamiento para el Piko PCR tiempo real, apoyado por “Cátedras CONACYT, Proyecto 2092” y al fondo FAI (UASLP- 2017) (Anexo 6).

6.11 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

El cronograma de actividades se encuentra en el Anexo 7.

VII. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y LEGALES

7.1 BENEFICIOS ESPERADOS PARA LA POBLACIÓN

El proyecto tuvo como finalidad proponer su utilización para generar un diagnóstico más certero a nivel histopatológico al ampliar la certeza aumentando la examinación en los niveles del bloque de parafina de biopsia de cérvix ya que en la actualidad la “Guía de referencia del diagnóstico y tratamiento del cáncer cervicouterino” y la “NOM-014-SSA2-1994, que habla de la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cervicouterino” no cuentan con un procedimiento específico para la realización de la técnica para el diagnóstico histopatológico. Así al modificar esta técnica diagnóstica se podrá dar pauta para generar una guía, un manual de procedimientos y/o sugerir la modificación de la norma, en las cuales los hospitales tendrán en que guiarse con sustento científico para generar un diagnóstico con mayor precisión al momento de realizar el estudio histopatológico.

7.2 NIVEL DE RIESGO

Esta investigación no presenta riesgos, ya que se utilizaron muestras de pacientes a partir del año 2014 hacia adelante, con supervisión directa de la institución, por lo que son mayores los beneficios esperados de esta investigación.

7.3 CARTA DE NO CONFLICTO DE INTERESES Y DERECHO DE AUTORIA Y CO-AUTORIA

Las cartas de no conflicto de intereses y la carta de derechos de autoría y co-autoría se presentan en los Anexos 8 y 9.

7.4 NORMAS NACIONALES E INTERNACIONALES

El protocolo se sometió a evaluación por el Comité de la Maestría en Salud Pública, el Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Enfermería y Nutrición de la UASLP y al Comité de Ética e Investigación del Hospital General de Soledad del Estado de San Luis Potosí para el desarrollo del proyecto.

7.4.1 Nacionales

Este protocolo está basado en el reglamento de la Ley General de Salud (LGS) en materia de investigación, específicamente en los siguientes apartados.

Del título segundo, capítulo uno se consideraron los siguientes artículos:

- Artículo 14, inciso V que señala que: se deberá contar con el consentimiento informado y por escrito del sujeto de investigación, por lo cual a cada persona que acepte participar en el estudio se le pedirá que firme el formato de consentimiento informado y se le entregará una copia del mismo.
- Artículo 16: en las investigaciones en seres humanos se protege la privacidad del individuo sujeto de investigación, identificándolo solo cuando los resultados lo requieran y éste lo autorice. La difusión de resultados de la investigación es de forma agrupada y en ningún caso se revela la identidad de las personas⁵⁶.

La investigación se apega también a los principios éticos fundamentalmente señalados para el desempeño correcto en todas las prácticas de enfermería, citados en el Código de Ética para las enfermeras y enfermeros de México entre los que se pueden resaltar los siguientes principios:

1. Beneficencia y no maleficencia: entendida como la obligación de hacer el bien y evitar el mal, regido por los deberes universales de hacer o promover el bien y prevenir, apartar y no infringir daño o maldad.

-
2. Autonomía: entendiéndola como el respeto a las personas como individuos libres, tomando en cuenta sus decisiones, producto de sus valores y convicciones personales. Este principio reconoce el deber de respetar la libertad individual que tiene cada persona para determinar sus propias acciones. El reconocimiento de la persona se da ética y jurídicamente con el respeto a la integridad de cada persona y con el consentimiento informado en el que consta, preferiblemente por escrito que comprende la información y está debidamente enterado en el momento de aceptar o rechazar los cuidados y tratamientos que se le proponen. A través del consentimiento informado se protege y hace efectiva la autonomía de la persona y es absolutamente esencial en los cuidados de enfermería.
 3. Privacidad: este principio se fundamenta en no permitir que se conozca la intimidad corporal o la información confidencial que directa o indirectamente sea obtenida sobre la vida y la salud de la persona, reservando esta dimensión existencial a una persona, grupo o familia.

Confiabilidad: refiriéndose a que el profesional de enfermería se hace merecedor de confianza y respeto por sus conocimientos y su honestidad al transmitir información, dar enseñanza, realizar los procedimientos propios de su profesión y ofrecer servicios de ayuda a las personas. El personal de enfermería debe mantener y acrecentar el conocimiento y habilidades para dar seguridad en los cuidados que brinda a las personas y a la comunidad⁵⁷.

7.4.2 Internacionales

La investigación propuesta en este protocolo se ajusta a la Declaración de Helsinki refiriéndose al apartado I correspondiente a los principios básicos, que en sus numerales 2, 9 y 11 señalan respectivamente lo siguiente:

2. El diseño y la realización de cualquier procedimiento experimental o no experimental, que implique a personas debe formularse claramente en un protocolo que debe presentarse a la consideración, comentario y guía de un

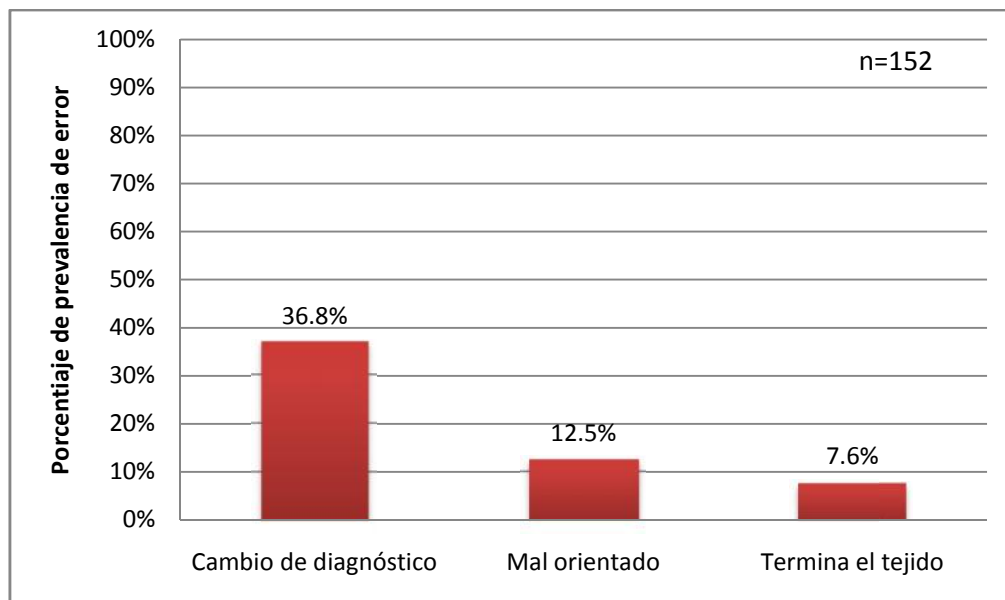
comité nombrado especialmente, independientemente del investigador y del promotor, siempre que este comité independiente actúe conforme a las leyes y ordenamientos del país en el que se realice el estudio experimental

9. En toda investigación con personas, cada participante debe ser informado suficientemente de los objetivos, métodos, beneficios y posibles riesgos previstos y las molestias que el estudio podría acarrear. Las personas deben ser informadas que son libres de no participar o de revocar en cualquier momento su consentimiento a la participación⁵⁸.

VIII. RESULTADOS

En la figura 20 se observa que el 36.8% de los diagnósticos a la examinación a los diferentes niveles del bloque de parafina de biopsia difieren del diagnóstico inicial realizado por la institución. Al igual que al momento de realizar las lecturas de las laminillas se percató que el 12.5% de éstas se encontraron mal orientadas lo cual dificultó su diagnóstico. Finalmente en las lecturas de las laminillas, se identificó que el 7.9% de los bloques de parafina de biopsia, el tejido se terminó gradualmente conforme se examinaba un mayor número de niveles.

Figura 20. Principales cambios y resultados a la examinación de los diferentes niveles de los bloques de parafina.

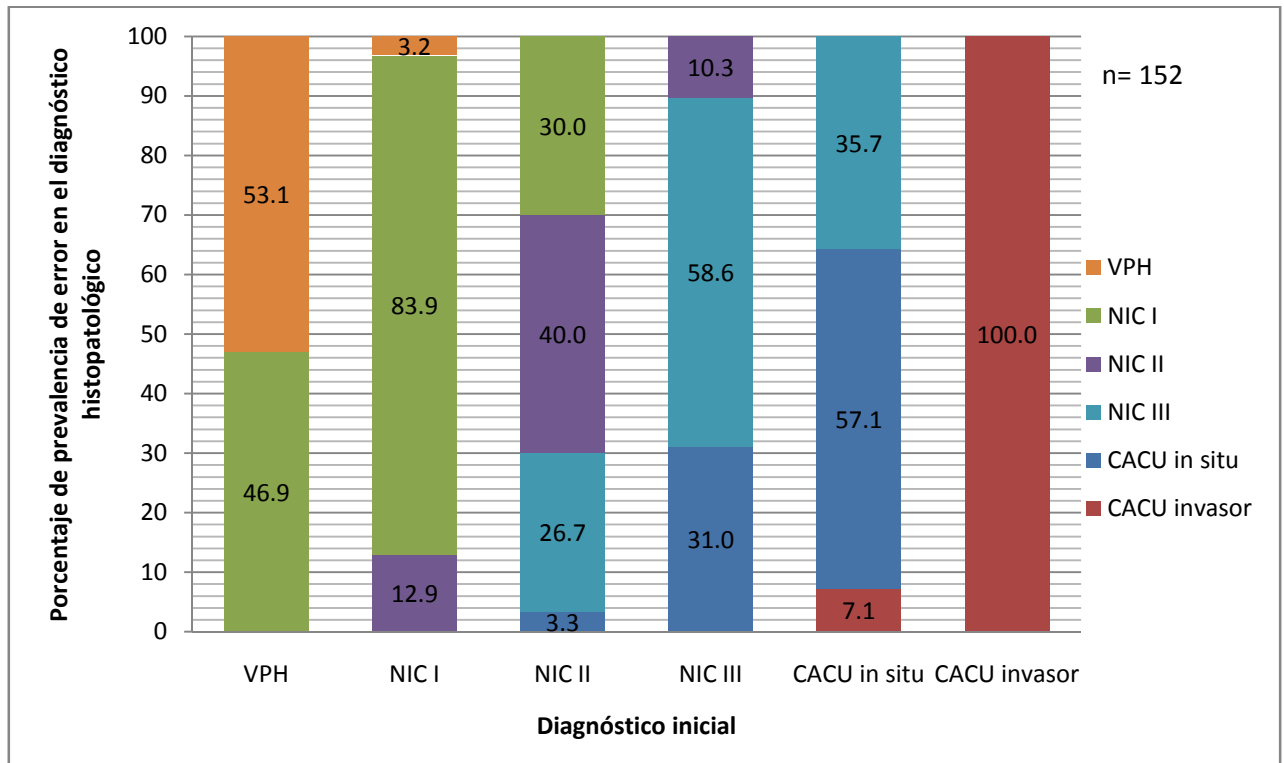


Fuente: Directa

A la examinación del segundo corte en el tercer nivel del bloque de parafina de biopsia se percató que el 46.9% del diagnóstico inicial por IVPH, correspondía en realidad NIC I. Para el diagnóstico inicial por NIC I, el 12.9% de las muestras pertenecía a una NIC II. En cuanto a NIC II, se encuentra que el 26.7% era por un diagnóstico de NICIII y un caso (3.3%) por CaCu *in situ* (figura 21).

Para el diagnóstico de NIC III, el 31% de estas muestras era por un CaCu *in situ*. En cuanto al diagnóstico por CaCu *in situ*, el 7.1% correspondía a CaCu invasor y finalmente para los casos de este último no cambia al segundo corte del segundo nivel (figura 12); todo lo anterior con un valor de (figura 21) ($p < 0.05$).

Figura 21. Cambio del diagnóstico inicial al segundo nivel del bloque de parafina.



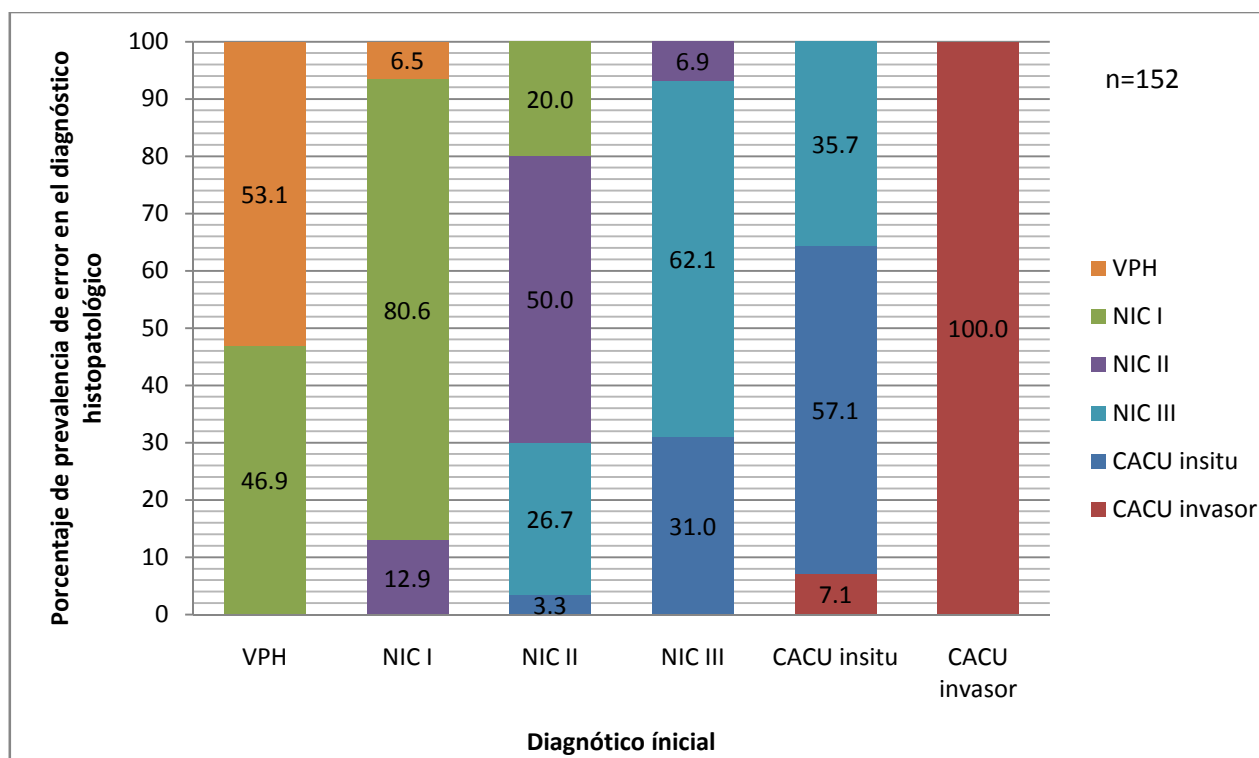
Fuente: Directa

A la examinación del tercer corte en el tercer nivel del bloque de parafina de biopsia, no hubo un cambio mayor que al segundo corte a este. El diagnóstico inicial por NIC I, aumentó un 6.5% para IVPH, disminuyendo el porcentaje de NIC I al 80.6% (figura 22).

En cuanto a NIC II, se encontró ahora que el 20% corresponde a NIC I. Para el diagnóstico de NIC III, el 6.9% perteneció a un NIC II. En los casos de CaCu *in situ*, los datos son similares a los del segundo corte del segundo nivel y

finalmente el CaCu invasor no cambió a la examinación del tercer nivel (figura 22); todo lo anterior con un valor de ($p < 0.05$).

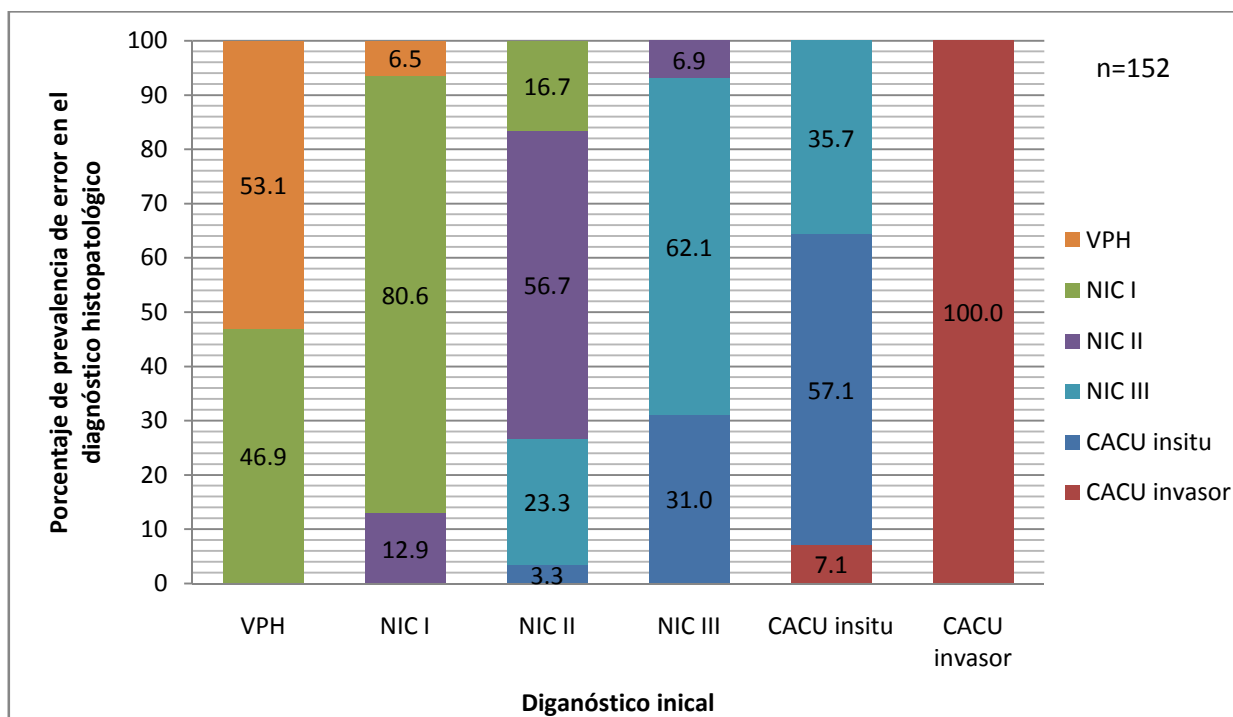
Figura 22. Cambio del diagnóstico inicial al tercer nivel del bloque de parafina.



Fuente: Directa

A la lectura de las laminillas del cuarto corte en el cuarto nivel del bloque de parafina de biopsia se percató que en cuanto a NIC II, se encuentra ahora que el 16.7% corresponde a NIC I. Observando que los diagnósticos no cambiaron del todo del tercer nivel al cuarto nivel (figura 23), todo lo anterior con un valor de ($p < 0.05$).

Figura 23. Cambio del diagnóstico inicial al cuarto nivel del bloque de parafina.



Fuente: Directa

En el cuadro 8 se puede observar la concordancia del diagnóstico realizado por el primer patólogo con el del segundo patólogo, en el cual nos dio un valor de coeficiente de Kappa del 0.673, lo que nos dice que si existe correlación entre las dos lecturas de las laminillas con un valor ($p < 0.05$).

Cuadro 8. Concordancia de diagnósticos histopatológicos.

n=152

| | | Diagnóstico 2 | | | | | | Total |
|---------------|---------------------|---------------|-------|--------|---------|-------------|--------------|-------|
| | | VPH | NIC I | NIC II | NIC III | CaCu insitu | CaCu invasor | |
| Diagnóstico 1 | VPH | 16 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 |
| | NIC I | 13 | 33 | 4 | 0 | 0 | 0 | 50 |
| | NIC II | 0 | 8 | 6 | 4 | 1 | 0 | 19 |
| | NIC III | 0 | 2 | 2 | 25 | 1 | 0 | 30 |
| | CaCu <i>in situ</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 3 | 18 |
| | CaCu invasor | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 | 17 |
| Total | | 29 | 45 | 12 | 29 | 17 | 20 | 152 |

Fuente: Directa

En el cuadro 9 de los diagnósticos que no coincidieron con el inicial, de los 21 casos que dieron positivo a la carga viral se puede observar una media de 4.27 ± 2.22 , una mediana de 3.2 con un rango de 2.6 a 9.9.

Cuadro 9. Análisis descriptivo de la carga viral

| Observaciones | Valores |
|-------------------|---------|
| Media | 4.2762 |
| Mediana | 3.2000 |
| Desv. típ. | 2.22529 |
| Varianza | 4.952 |
| Mínimo | 2.60 |
| Máximo | 9.90 |

Fuente: Directa

n=53

En el cuadro 10 se observa que podría existir una correlación entre el diagnóstico de lesiones cervicales y la carga viral, esto con un coeficiente de correlación de 0.072 y un valor de $p > 0.05$.

Cuadro 10. Correlación del diagnóstico histopatológico y carga viral. n=53

| | | Diagnóstico | Carga Viral |
|-------------|----------------------------|-------------|-------------|
| Diagnóstico | Coeficiente de correlación | 1.000 | 0.072 |
| | Significancia bilateral | | 0.756 |
| Carga Viral | Coeficiente de correlación | 0.072 | 1.000 |
| | Significancia bilateral | 0.756 | |

Fuente: Directa

En el cuadro 11 se pueden observar que el genotipo -31 es el más común de los datos analizados con un 39% seguido del genotipo -16 con un 22%, de los cuales las lesiones más afectadas por estos virus son la NIC I (90%), la IVPH (84%) y la NIC III (60%).

Cuadro 11. Principales genotipos por VPH encontrados por lesiones cervicales.

n=152

| Diagnóstico | VPH- 16 | VPH-18 | VPH-31 | VPH-33 | VPH-35 | VPH-39 | VPH-58 | VPH-68 | Total |
|---------------------|----------|---------|----------|--------|---------|--------|---------|---------|-------|
| IVPH | 1 (8%) | | 10 (84%) | | | | 1 (8%) | | 12 |
| NIC I | 1 (5%) | | 17 (90%) | | | 1 (5%) | | | 19 |
| NIC II | 3 (30%) | | 5 (50%) | | | | 1 (10%) | 1 (10%) | 10 |
| NIC III | 6 (60%) | | 3 (30%) | | | | 1 (10%) | | 10 |
| CaCu <i>in situ</i> | 1 (33%) | | 1 (33%) | | 1 (33%) | | | | 3 |
| CaCu invasor | | 1 (25%) | 3 (75%) | | | | | | 4 |
| Total | 12 (22%) | 1 (1%) | 39 (68%) | | 1 (1%) | 1 (1%) | 3 (6%) | 1 (1%) | 58 |

Fuente: Directa

Se pudieron detectar co-infecciones, entre los cuales las más comunes fueron por los genotipos de VPH -16 y -31 con un 44%, seguida por los VPH-18, -31 y los VPH-31, -33 con un 14%, de los cuales las lesiones precancerosas más afectadas por estos genotipos fueron el NIC I, NI III y el CaCu *in situ* (cuadro 12).

Cuadro 12. Principales co-infecciones por VPH encontrados en lesiones cervicales.

n=152

| Diagnóstico | VPH- 16, 31 | VPH-16, 31, 33 | VPH-16, 31, 18 | VPH-16, 58 | VPH-18, 31 | VPH-31, 33 | VPH-52, 58 | Total |
|----------------------------|-------------|----------------|----------------|------------|------------|------------|------------|-------|
| IVPH | | | | | | | | |
| NIC I | 3 (52%) | 1 (16%) | | | 1 (16%) | 1 (16%) | | 6 |
| NIC II | | | | 1 (33%) | 1 (33%) | | 1 (33%) | 3 |
| NIC III | 3 (50%) | | | 1 (16%) | | 2 (34%) | | 6 |
| CaCu <i>in situ</i> | 3 (75%) | | 1 (25%) | | | | | 4 |
| CaCu invasor | 1 (33%) | 1 (33%) | | | 1 (33%) | | | 3 |
| Total | 10 (44%) | 2 (9%) | 1 (5%) | 2 (9%) | 3 (14%) | 3 (14%) | 1 (5%) | 22 |

Fuente: Directa

IX. DISCUSIÓN

Nuestros resultados concuerdan con la guía de práctica clínica para la patología ginecológica en el que se menciona que se requieren por lo menos tres niveles de corte para la precisión diagnóstica, ya que en nuestros resultados, se observa que al segundo nivel, se obtiene un diagnóstico confirmatorio y que este no cambia conforme se siguen examinando más número de niveles, sin embargo nos percatamos en algunos casos de nuestro estudio seguir avanzando a los niveles en el bloque de parafina de biopsia de cérvix, este podrían llegar a terminar el tejido, lo que provocó que se diagnosticaran neoplasias de un grado por debajo del cual ya había sido diagnosticado previamente, esto podría ser a consecuencia de que la biopsia al momento de ser extraída no haya sido del tamaño recomendado como lo recomienda esta guía que es de 2-4 mm aproximadamente¹³.

También podríamos mencionar que del 7.9% de las muestras de donde se iba terminado el tejido gradualmente, se observó que aún se encontraban zonas valorables, en donde se detectó el mismo diagnóstico que el inicial sin embargo, esto podría ser a consecuencia de lo anterior ya mencionado, es por eso que la guía de práctica clínica para la patología ginecológica refiere, que en aquellos especímenes donde hace falta epitelio superficial o la unión escamocolumnar o en circunstancias donde puede que exista una discrepancia entre los hallazgos histológicos se recomienda examinar más de un nivel además de realizarlo cuando se sospecha de una enfermedad invasiva sobre la base de la histología¹³.

Otro hallazgo interesante en nuestro estudio, es que del 12.5% de los casos se encontraban mal incluidos, lo que provocó una dificultad al momento de realizar el diagnóstico, ya que se encontraban con el estroma mal orientado, observando principalmente vasos sanguíneos, sin embargo, se pudieron visualizar en las laminillas zonas valorables para el diagnóstico.

En una investigación del 2005 Joste y colaboradores estudiaron la discrepancia entre los resultados de la técnica del Papanicolaou que mostraban algún tipo de lesión intraepitelial cervical y la biopsia mostraba un resultado negativo. En donde examinaron las diapositivas seleccionadas para detectar la presencia de algún grado de NIC, en las cuales 27 biopsias (24.3%) de una muestra de 111, demostraron la presencia de algún NIC en niveles más profundos; esto se correlaciona con nuestro estudio, debido a que nuestros resultados refieren que el 36.8% tuvieron un cambio en el diagnóstico al seccionar a más niveles en el bloque de parafina de biopsia de cérvix lo que quiere decir que, niveles adicionales son una forma productiva de confirmar lesión intraepitelial cervical⁵⁹, , sin embargo, se mostró que a la lectura de las laminillas el único diagnóstico que no cambió a la examinación de más número de niveles fue el CaCu invasor, ya que se pudo haber encontrado una diferencia entre un CaCu micro invasor y un CaCu invasor, no obstante el 100% de las lecturas coincidieron con la inicial.

En otra investigación de Vivian y colaboradores en el año de 2002, se investigó el número de niveles para el diagnóstico de biopsias cervicales, el cual consistía que en 241 biopsias de cérvix, se tomó el primer nivel aproximadamente a un tercio del camino hacia el bloque, el segundo a aproximadamente 40% y el tercero a aproximadamente 55% a 60% del camino hacia el bloque, metodología que se asemeja a nuestra investigación, sin embargo, la diferencia es que nosotros examinamos un nivel más. Subsecuentemente se comparó el diagnóstico de la revisión con el diagnóstico patológico realizado en el momento en que la biopsia se recibió por primera vez en el laboratorio. En este estudio se obtuvo como resultado, que hubo una discrepancia entre el primer diagnóstico de revisión y el diagnóstico original en 17% de los casos, sin embargo aunque nuestra muestra es más pequeña, se pudo observar que la discrepancia al diagnóstico original en nuestro estudio aumenta al

36.8%⁶⁰, refiriendo que la examinación a una mayor profundidad de la biopsia de cérvix podría dar una mayor precisión al diagnóstico histopatológico.

En un artículo publicado en 2001, por Heatley, realizaron un estudio en el cual, tomaron fragmentos de la biopsia y los repartieron en diferentes bloques de parafina, las cuales tienden a ser menos profundas y no generar un cambio significativo en el diagnóstico histopatológico al examinar niveles más profundos, ya que sólo resultó en 1 caso la identificación de una lesión de alto grado, que previamente ha sido considerado como negativo, y en 2 casos donde sólo se identificó una lesión de grado bajo previamente, lo cual sólo genera un mayor gasto en las instituciones de salud ya que se requiere mayor número de bloques para su inclusión¹¹.

Sin embargo, este enfoque afecta sustancialmente la carga de trabajo del patólogo, influyendo en el proceso como en el tiempo analítico del material, los costos, otros recursos de laboratorio, entre otros y esto debe tenerse en cuenta cuando se elaboran directrices para el procesamiento de estas muestras, a la sugerencia de considerar realizar la examinación de un mayor número de niveles en el bloque de parafina. Por otro lado, se deben realizar más investigaciones que incluyan estudios comparativos para dilucidar la relación entre la intensidad de las biopsias por escisión cervical seccionadas y el rendimiento diagnóstico histopatológico costo-beneficio.

Sin embargo con nuestros resultados aunque se podría llegar a aumentar los costos de la institución, por los insumos que se utilizan para realizar el diagnóstico histopatológico y la carga de trabajo por parte del histotecnólogo y por el patólogo, se verá reflejado más adelante como un costo-beneficio para las mujeres que tienen alguna lesión cervical, ya que podrían mejorar la precisión diagnóstica, además de dar un tratamiento oportuno y certero a las mismas, disminuyendo los gastos de tratamiento, que disminuirían un 97.2% a diferencia de lo que se requiere para un diagnóstico primario²².

En otro estudio en 2007 Fadare y Rodríguez revisaron 600 biopsias de las cuales 511 fueron NIC I y 89 con un diagnóstico de NIC 2 y NIC 3, las cuales se cortaron en 6 secciones consecutivas, a diferencia que nuestra investigación sólo realizó 4, del mismo grosor de los cortes a las de ellos que fueron de 4 a 5 μ m del bloque de parafina, grosor adecuado para la correcta lectura de las laminillas, ya que más gruesas podría dificultar el análisis de las mismas¹³; en sus resultados se muestra que el 79.8% de los casos de NIC 2 y 3 fueron diagnosticables en el nivel 1, en comparación con el 56% de los casos de NIC I. Finalmente encontraron que en 6 biopsias en las que los diagnósticos NIC 2 y 3 se diagnosticó en los niveles 3 y 4, sin embargo en los niveles anteriores mostraron una NIC 1¹⁰; datos que se asemejan a nuestros resultados sin embargo en uno de los casos que estaba diagnosticado con NICII, se encontró a la examinación un CaCu *insitu*, si bien es cierto que el tratamiento es similar en los casos de NIC I, NIC II y NIC III, el tratamiento cambia a un diagnóstico por CaCu; otro dato relevantes es que aunque el tratamiento sea similar para las displasias sin llegar a un cáncer, por lo menos a nivel epidemiológico es relevante y con un nivel de impacto en el sector de salud pública, ya que al momento de tener datos más certeros, se podrá dar pauta a generar nuevas políticas públicas a través de los resultados de la precisión diagnóstica, la mejora del tratamiento de los mismos, para así generar mayores acciones en materia de prevención.

Para los datos de genotipificación de los diferentes VPH, los datos difieren a un estudio de De la Rosa y colaboradores en el cual ellos mostraron que el virus más prevalente en mujeres de San Luis Potosí, en su población fue de VPH-31 (33.1%), -16 (16.6%) y -18 (6.7%); en nuestro estudio el VPH más prevalente es hasta el momento de VPH-31 (68%), VPH-16 (22%), al igual se encontraron coinfecciones de diferentes tipos virales como el de VPH-16 y -31 (44%), VPH-18 y -31 (14%) y VPH-31 Y 33 (14%). Otro dato relevante que cabe destacar es que en su estudio la prevalencia por genotipos virales fue por CaCu (90.5%) y en nuestro estudio la prevalencia fue de (17.5%)⁶¹.

Estos resultados han permitido determinar diferentes tipos virales al igual que co-infecciones, los cuales seguirán sirviendo como base para la planificación de estudios e intervenciones que ayuden a la mejora de la detección oportuna y el control sobre las neoplasias cervicales basadas en estas evidencias, sin embargo nuestros datos no concuerdan con lo publicado con Lopez-Revilla y colaboradores en sus estudios de 2008, en donde sus genotipos más frecuentes son los VPH-33, -18 y -16⁶², sin embargo estos datos confirma la importancia de la vigilancia epidemiológica a través de la tipificación de VPH en regiones específicas.

Los resultados de carga viral difieren con los publicados por Guqun y colaboradores en los cuales se menciona que entre mayor sea la lesión intraepitelial cervical, la carga viral aumenta⁶², al igual lo que sugiere Tabora y colaboradores, en donde se muestra que la carga viral aumenta conforme aumenta la edad y la lesión⁶³, sin embargo nuestros datos reportan una discrepancia en los diferentes casos ya que nuestros resultados reportan que no existe una correlación entre el aumento de las lesiones cervicales con la carga viral, esto podría deberse a que el número de la muestra es de 23 casos positivos para los datos analizados.

Todo lo anterior confirma nuestra hipótesis, que a la examinación de un mayor número de niveles se obtiene un diagnóstico confirmatorio, ya que aunque el estudio histopatológico se considera un estándar de oro, en realidad, puede no ser perfecto; a pesar de los criterios histopatológicos conocidos para el diagnóstico de las lesiones cervicales, la interpretación histopatológica final es subjetiva y, como tal, propensa a una alta variabilidad intraobservador; la cual también puede estar asociada a la falta el epitelio de unión escamocolumnar u otro epitelio y al error al momento de la inclusión del tejido de biopsia en el bloque de parafina.

La sospecha de que la enfermedad invasiva puede estar presente en función de las características histológicas del material examinado previamente, o sobre la base de una sospecha clínica, colposcopia o citológica de enfermedad

invasiva, para así justificar niveles más para la precisión diagnóstica, por lo que si se identifican otras áreas sospechosas, el patólogo puede elegir examinar material adicional.

El examen de múltiples niveles se ha citado como un medio para evitar el error de diagnóstico y las consiguientes demandas por negligencia profesional. Aunque la experiencia y la intuición sugieren que esta es una práctica correcta, se sugiere que se realicen más investigaciones sobre el número óptimo de niveles necesarios para generar una mayor precisión diagnóstica.

X. CONCLUSIÓN

En conclusión, el objetivo del estudio era examinar la variabilidad del diagnóstico histopatológico a un mayor número de niveles de los diferentes grados de neoplasias, los resultados apoyan a la hipótesis, de que el diagnóstico cambia al revisar un nivel más del que realizan actualmente en los servicios de patología de las instituciones de salud.

Por lo que al aumento de revisión de los bloques de parafina podría generar una mayor precisión diagnóstica; por lo que se tiene que seguir estudiando sobre este tema para así generar políticas de salud o bien el cambio de la norma 014, para establecer una técnica estandarizada para obtener mejores resultados sobre el seguimiento y tratamiento de las pacientes que pudieran cursar alguna lesión intrepitelial cervical.

XI. RECOMENDACIONES

- Para futuras investigaciones, se sugiere que se examine todo el bloque de parafina, ya que para este estudio, se limitó el corte de todo el bloque de parafina, por lo que sería interesante observar qué hay al final de la biopsia.
- Otra sugerencia, es que si se planea genotipificar o medir nuevamente la carga viral, se tomen muestras frescas (toma de células descamadas del cérvix) de las pacientes ya que se pudo observar que al extraer el DNA no se encontraba integro, debido al proceso que se lleva a cabo para la inclusión de la biopsia al bloque de parafina.
- Para la carga viral aumentar la muestra a más número de casos positivos para el análisis de los datos, podría aumentar la correlación entre estos con el aumento de las lesiones cervicales.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castro-Vásquez MdC, Arellano-Gálvez MdC. Acceso a la información de mujeres con VPH, displasia y cáncer cervical in situ. *salud pública de méxico*. 2010;52(3):207-212.
2. Cartaya Olano M, Hernández Sáez I, González Sáez Y, Álvarez Cisneros NdP. Factores de riesgo del cáncer cérvico-uterino. *Revista Archivo Médico de Camagüey*. 2010;14(5):0-0.
3. Castellsagué X, de Sanjosé Llongueras S, Bosch F. Epidemiología de la Infección por VPH y del cáncer de cuello de útero: nuevas opciones preventivas. *Carreras Collado R. Virus del Papiloma Humano y Cáncer de Cuello de Útero. México: Editorial Médica Panamericana*. 2007:1-25.
4. Moscicki A-B, Schiffman M, Burchell A, et al. Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. *Vaccine*. 2012;30:F24-F33.
5. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*. 1997;22(1):130-139.
6. Manos M. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells 7. Molecular Diagnostics of Human Cancer*. 1989.
7. de Roda Husman A-M, Walboomers JMM, van den Brule AJC, Meijer CJLM, Snijders PJF. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3 ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology*. 1995;76(4):1057-1062.

-
8. J. G, M. C, WC. H, N. J, A. G, N. W. La histopatología de cuello uterino, variabilidad entre laboratorios: a nivel estatal investigación basada en la población. Vol 3: Am J Clin Pathol 2015:330-335.
 9. DePriest PD, van Nagell Jr JR, Powell DE. Microinvasive cervical cancer. *Clinical obstetrics and gynecology*. 1990;33(4):846-851.
 10. Fadare O, Rodriguez R. Squamous dysplasia of the uterine cervix: tissue sampling-related diagnostic considerations in 600 consecutive biopsies. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2007;26(4):469-474.
 11. Heatley MK. How many histological levels should be examined from tissue blocks originating in cone biopsy and large loop excision of the transformation zone specimens of cervix? *Journal of clinical pathology*. 2001;54(8):650-651.
 12. International Agency for Research on C. GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012; 2012.
 13. Brown L, Andrew A, Hirschowitz L, Millan D. Tissue pathways for gynaecological pathology. *London: The Royal College of Pathologists*. 2008.
 14. Fernández CC, Delgado UJ. La carga del cáncer cervico-uterino y de la infección por virus del papiloma humano en México y en el mundo. *Ginecol Obstet México*. 2011;79(12):788-793.
 15. Inegi. Anuario estadístico de los Estados Unidos Mexicanos 2012: Instituto Nacional de Estadística y Geografía México; 2012.
 16. Salud Sd. Estadísticas de cáncer de mama y cáncer cervicouterino. México; 2015.

-
17. Cardona-Arias J, Puerta-Suárez J, Flórez-Duque J. Prevalencia del virus papiloma humano y sus factores de riesgo en hombres: revisión sistemática. *Infectio*. 2011;15(4):268-276.
 18. Sánchez AA, Grimaldo JF, Alarcón CES. Factores de riesgo para el desarrollo de la displasia leve cervical. *Medigraphic Artemisa, RevFacMed UNAM*. 2009;52(2).
 19. Bosch FX, Muñoz N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus research*. 2002;89(2):183-190.
 20. Vicuña NC, Hernández GA, Alcázar LF, Muruchi Garrón GW, Zúñiga IP. Cáncer cervicouterino. *Anales de Radiología, Mexico*. 2009;8(1).
 21. Sánchez-Barriga J. Tendencias de mortalidad por cáncer cérvico-uterino en las siete regiones socioeconómicas y en las 32 entidades federativas de México en los años 2000-2008. *Gac Med Mex*. 2012;148:42-51.
 22. Sánchez-Román FR, Carlos-Rivera FdJ, Guzmán-Caniupan JA, Escudero-de los Ríos P, Juárez-Pérez CA, Aguilar-Madrid G. Costos de atención médica por cáncer cervicouterino. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2012;50(1).
 23. Tapia, Conyer R. Sarti E KP, Ruíz-Matus C, Velázquez O. Cáncer cervicouterino: El Manual de Salud Pública. México: Intersistemas; 2003:735-754.
 24. Salud OPd. Prevención y control integrales del cáncer cervicouterino: un futuro más saludable para niñas y mujeres Washington, D.C.: OPS; 2013.
 25. Olaya M, Uribe AM. Procesamiento de las biopsias en cono de cuello uterino en Colombia. *Universitas Médica*. 2016;53(1):26-32.

-
26. Arbyn M, Anttila A, Jordan J, et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. —summary document. *Annals of Oncology*. 2010;21(3):448-458.
 27. de Gobierno G, Transversal E, Cercano G. Plan Nacional de Desarrollo 2013-2018. *Gobierno de la República. México. DF*. 2013.
 28. Nom NOM. 014-SSA2-1994, Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cérvico uterino. *Diario Oficial*. 2007.
 29. Hitchcock A. Tumors of the cervix, vagina, and vulva. Atlas of tumor pathology. Third series, Fascicle 4. RJ Kurman, HJ Norris and EJ Wilkinson, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1992. No. of pages: 262. Price: \$45. ISBN: 11 881041 02 6: Wiley Online Library; 1993.
 30. Serman F. Cáncer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus papiloma humano: perspectivas en prevención y tratamiento. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*. 2002;67(4):318-323.
 31. Mohar A, Frías-Mendivil M, Suchil-Bernal L, Mora-Macías T, Garza JG. Descriptive epidemiology of cancer at the Instituto Nacional de Cancerología of Mexico. *salud pública de méxico*. 1997;39(4):253-258.
 32. Perera FP. Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1996;88(8):496-509.
 33. Croce CM. Oncogenes and cancer. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(5):502-511.
 34. El D, Rojas MA, Barrera SHA, Ortiz LR. Los virus: Una importante causa de neoplasias en los seres humanos. *Rev Invest Clin*. 2004;56:495-506.

-
35. Murillo R, Almonte M, Pereira A, et al. Cervical cancer screening programs in Latin America and the Caribbean. *Vaccine*. 2008;26:L37-L48.
 36. Salud Sd. Programa de acción específico, prevención y control del cáncer en la mujer 2013-2018; 2013.
 37. García Carrancá A, V Gariglio P. Aspectos moleculares de los papilomavirus humanos y su relación con el cáncer cérvico-uterino. *Rev. invest. clín.* 1993;45(1):85-92.
 38. Niederhuber JE, Armitage JO, Doroshow JH, Kastan MB, Tepper JE. *Abeloff's Clinical Oncology E-Book*: Elsevier Health Sciences; 2013.
 39. Flores-Miramontes MG, Torres-Reyes LA, Aguilar-Lemarroy A, et al. Prevalencia de genotipos de VPH en México y en el mundo detectados mediante Linear Array. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2015;53(S2):122-130.
 40. Palo D, Chanen W, Dexeus S. *Coloscopia y patología del tracto genital inferior*. Panamericana; 1996.
 41. Jenkins D. Histopathology and cytopathology of cervical cancer. *Disease markers*. 2007;23(4):199-212.
 42. Sarduy Nápoles MR. Neoplasia Intraepitelial Cervical: preámbulo del cáncer cérvicouterino. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 2008;34(2):0-0.
 43. Martínez SV. Citología cervical. *Rev Med Hondur*. 2005;73:131-136.
 44. Valdivia MMC, Ceballos ABQ. Neoplasia intraepitelial cervical en mujeres menores de 25 años. *Revista Finlay*. 2012;2(1):45-49.

-
45. Medina-Villaseñor E, Oliver-Parra P, Neyra-Ortiz E, Pérez-Castro J, Sánchez-Orozco J, Contreras-González N. Neoplasia intraepitelial cervical, análisis de las características clínico patológicas. *GAMO*. 2014;13(1):12-25.
 46. Agüero A, Castillo K, González Blanco M. Neoplasia intraepitelial cervical de alto grado en mujeres menores de 25 años y mayores de 45 años. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*. 2012;72(2):89-102.
 47. College of American P. Cancer protocol templates. *CAP Web site*. [cited March 31, 2015] Available from: < [http://www. cap. org/web/home/resources/cancer-reporting-tools/cancer-protocol-templates](http://www.cap.org/web/home/resources/cancer-reporting-tools/cancer-protocol-templates). 2014.
 48. Oncoguía S. Cáncer de cuello uterino 2008. *Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico i mamario*. 2008.
 49. Vargas-Revilla T, Seáñez-de-Villa JM, León-Rovira N, Barrón-Cano OM. Métodos para la detección oportuna de cáncer cervicouterino. *Revista Tecnología en Marcha*. 2014;27:52-59.
 50. de Consensos Intersociedades PN, de Enfermedades PAdC, Argentina AM, et al. Consenso Nacional Intersociedades sobre Cáncer de Cuello Uterino Agosto 2015. *Revista Argentina de Radiología*. 2017.
 51. Slaoui M, Fiette L. Histopathology procedures: from tissue sampling to histopathological evaluation. *Drug Safety Evaluation*: Springer; 2011:69-82.
 52. Vega MSMQ, Gómez JFC, Bastidas M, Márquez L, Pons JP. Detección y tipificación de virus del papiloma humano (VPH) mediante PCR-RFLP. *Obstetricia y Ginecología*. 2008;68(1):25-31.
 53. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical microbiology reviews*. 2003;16(1):1-17.

-
54. Lillo FB, Lodini S, Ferrari D, et al. Determination of human papillomavirus (HPV) load and type in high-grade cervical lesions surgically resected from HIV-infected women during follow-up of HPV infection. *Clinical infectious diseases*. 2005;40(3):451-457.
 55. Hernández Menéndez M, Ríos Hernández MdlÁ, Aguilar Vela de Oro O, Torres Chávez A. Actualización de la terapéutica del papilomavirus humano: Terapia convencional. *Revista Cubana de Medicina*. 2004;43(1):0-0.
 56. de la Salud P. Reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud. 1987.
 57. Código de ética para enfermeras; 1973.
 58. Mundial AM. Declaración de Helsinki. Principios éticos para la investigación en seres humanos. *Boletín del Consejo Académico de Ética en Medicina*. 2014;1(2).
 59. Joste NE, Wolz M, Pai RK, Lathrop SL. Noncorrelating Pap tests and cervical biopsies: histological predictors of subsequent correlation. *Diagnostic cytopathology*. 2005;32(5):310-314.
 60. Luo YV, Prihoda TJ, Sharkey FE. Number of levels needed for diagnosis of cervical biopsies. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2002;126(10):1205-1208.
 61. Shen G, Cheng J, Wang Y, Zhou P, Zhang G. Viral DNA load of high-risk human papilloma virus is closely associated with the grade of cervical lesions. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2014;7(12):5826.

-
62. López-Revilla R, Martínez-Contreras LA, Sánchez-Garza M. Prevalence of high-risk human papillomavirus types in Mexican women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Infectious agents and cancer*. 2008;3(1):3.
 63. Tábora N, Ferrera A, Bakkers JMJE, Massuger LFAG, Melchers WJG. High HPV 16 viral load is associated with increased cervical dysplasia in Honduran women. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2008;78(5):843-846.

XIII. ANEXOS



ANEXO 1. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE ENFERMERÍA Y NUTRICIÓN
MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA



Variable independiente

| Variable | Definición | Tipo | Operacional |
|-----------------------------|---|---------|--|
| Diagnóstico Histopatológico | Estudio al microscopio de los tejidos orgánicos: las anomalías que se detecten permiten realizar un diagnóstico de una patología determinada. | Ordinal | 1:VPH 2:NIC I 3: NIC II 4: NIC III 5: CaCu |

Variables dependientes

| Variable | Definición | Tipo | Operacional |
|-------------|---|---------|--|
| NIC | La neoplasia cervical intraepitelial es un crecimiento anormal y pre-canceroso de células escamosas en el cuello uterino. | Ordinal | 1: NIC I 2: NIC II 3: NIC III |
| CaCu | El cáncer cérvicouterino es una tumoración maligna que se presenta en el cuello de la matriz. | Ordinal | 1: CaCu insitu 2: CaCu invasor |
| Carga Viral | La carga viral es el término empleado para referirse a la cantidad de virus en sangre. | Ordinal | 1: Carga viral deNIC I 2: Carga viral deNIC II 3: Carga viral de NIC III 5: Carga viral de CaCu <i>insitu</i> |

**ANEXO 2. CARTA DE APROBACIÓN DEL COMITÉ
DE LA MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA**



UASLP

Universidad Autónoma
de San Luis Potosí

Marzo 28, 2017.

**EDGAR VILLEGAS HINOJOSA
ALUMNO DE LA MAESTRIA ES SALUD PÚBLICA
GENERACION 2016-2018
P R E S E N T E.-**

Por este conducto le informamos que en sesión del Comité Académico de Salud Pública, celebrada el 27 de marzo del presente año, se registró y aprobó su protocolo de tesis denominado "SENSIBILIDAD DEL DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO CON RESPECTO A LA CARGA VIRAL DEL VPH EN NIC Y CACU", con clave GIX 12-2017.

Sin otro particular, reiteramos la seguridad de nuestra atenta y distinguida consideración.

"SIEMPRE AUTÓNOMA. POR MI PATRIA EDUCARÉ"

Integrantes del CA-MSP

Dra. Yesica Yolanda Rangel Flores

Dra. Verónica Gallegos García

Dr. Luis Eduardo Hernández Ibarra

MSP. Ma. Guadalupe Guerrero Rosales

Dra. Ma. Del Carmen Pérez Rodríguez

Dra. Claudia Inés Victoria Campos

Dr. Darío Gaytán Hernández

Dra. Paola Algara Suarez

FIRMA





**FACULTAD DE
ENFERMERÍA
Y NUTRICIÓN**

Av. Niño Artillero 130
Zona Universitaria • CP 78240
San Luis Potosí, S.L.P., México
tels. (444) 826 2300
Ext. Recepción 5010 y 5011
Administración 5063
Posgrado 5071
www.uaslp.mx

Archivo Posgrado
DRA'YYRF/rpm

**ANEXO 3. CARTA DE APROBACIÓN DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN
DE LA FACULTAD DE ENFERMERÍA Y NUTRICIÓN**



UASLP

Universidad Autónoma
de San Luis Potosí

**EVALUACIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN POR EL COMITÉ DE ÉTICA EN
INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE ENFERMERÍA Y NUTRICIÓN DE LA UASLP.**

Título del proyecto: SENSIBILIDAD DEL DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO POR AUMENTO DE CORTES A DIFERENTES NIVELES EN EL BLOQUE DE PARAFINA DE NIC Y CACU.

Responsable: Edgar Villegas Hinojosa.

Fecha: 6 de abril de 2017.

| Crterios | Presente | Ausente | No Aplica | Observaciones |
|---|----------|---------|-----------|---------------|
| 1. Se incluye el titulo del proyecto. | X | | | |
| 2. Se mencionan autores, coautores y colaboradores. | X | | | |
| 3. El protocolo de investigación incluye los elementos minimos señalados en el anexo 2. | X | | | |
| 4. Presenta el apartado de consideraciones éticas y legales. | X | | | |
| 5. Muestra coherencia de los elementos éticos presentados con especificidad y fundamentación al tipo de estudio. | X | | | |
| 6. Menciona la normatividad nacional e internacional sobre los elementos éticos a desarrollar en el proyecto, desde su estructuración hasta la publicación de resultados. | X | | | |
| 7. Señala la coherencia de los elementos metodológicos a desarrollar con los aspectos de consideración ética. | X | | | |
| 8. Presenta carta de consentimiento informado de acuerdo a la especificidad metodológica y riesgo del estudio. | X | | | |
| 9. Se explicita el apoyo financiero con relación al compromiso de la publicación de los resultados. | X | | | |
| 10. Presenta la declaración y especificación de la ausencia de conflictos de interés de los miembros del equipo para el desarrollo del proyecto. | X | | | |
| 11. Aclara los mecanismos de transferencia de los productos de la investigación. (Patente) | | | X | |
| 12. Especifica los procedimientos para garantizar el derecho de autor en la investigación. (Carta de no conflicto de intereses) | X | | | |



**FACULTAD DE
ENFERMERÍA
Y NUTRICIÓN**

Av. Niño Artillero 130
Zona Universitaria • CP 78240
San Luis Potosí, S.L.P., México
tels. (444) 826 2300
Ext. Recepción 5010 y 5011
Administración 5063
Posgrado 5071
www.uaslp.mx



UASLP
Universidad Autónoma
de San Luis Potosí

Dictamen: Se otorga registro CEIFE-2017-211.

Se solicita enviar un reporte sobre el avance del proyecto al correo de este comité ceife.uaslp@gmail.com en un plazo de seis meses.

Atentamente,

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE ENFERMERÍA Y NUTRICIÓN



**FACULTAD DE
ENFERMERÍA
Y NUTRICIÓN**

Av. Niño Artillero 130
Zona Universitaria • CP 78240
San Luis Potosí, S.L.P., México
tels. (444) 826 2300
Ext. Recepción 5010 y 5011
Administración 5063
Posgrado 5071
www.uaslp.mx

ANEXO 4. CARTA DE APROBACIÓN DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN
DEL HOSPITAL GENERAL DE SOLEDAD

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN



SERVICIOS
DE SALUD



HOSPITAL GENERAL DE SOLEDAD DE GRACIANO SÁNCHEZ
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

PROLONGACIÓN VALENTÍN AMADOR N° 1112, ESQ. CALLE DE LA FLOR, COL. RIVAS GUILLÉN,
SOLEDAD DE GRACIANO SÁNCHEZ, S.L.P.
TELS. 8 26 01 00 EXT. 24008

Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P., 05 de Septiembre de 2017.

LIC. ENF. EDGAR VILLEGAS HINOJOSA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

PRESENTE.-

Por este conducto me dirijo a Usted en referencia a su **Protocolo de Investigación** titulado " **Sensibilidad del Diagnostico Histopatológico, por aumento de cortes a diferentes niveles en el bloque de parafina de NIC y CaCu** ", asignado con la clave: **CEI-HGS-001-20**.

Dicho Protocolo fue evaluado el día 18 de Julio de 2017; cumpliendo con los aspectos del marco ético requeridos por lo que en forma colegiada fue **ACEPTADO** por los miembros del Comité de Ética en Investigación de este Hospital.

Así mismo, le solicitamos nos haga llegar los informes correspondientes del avance de su Protocolo de Investigación; así como un informe final, recordándole además que este proyecto podrá ser monitoreado por este Comité.

Departamento de Educación e Investigación en Salud



DR. ERIK GALVÁN SÁNCHEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
HOSPITAL GENERAL DE SOLEDAD DE GRACIANO SÁNCHEZ

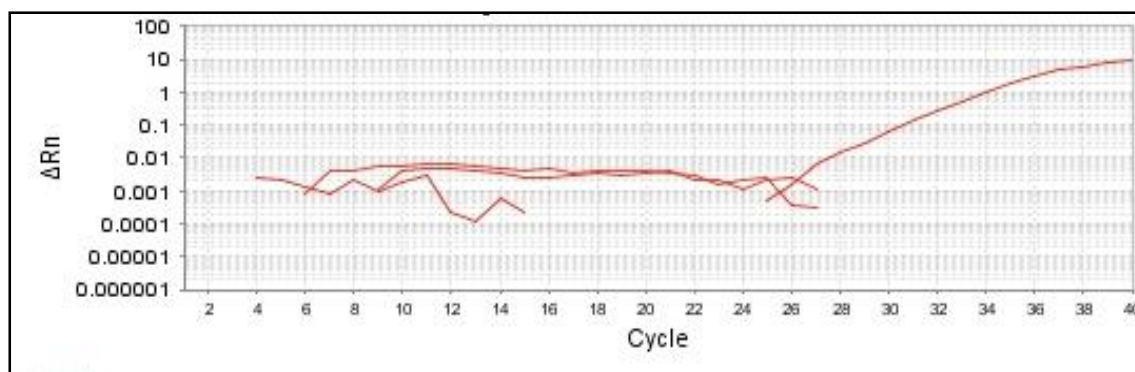
ANEXO 5. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA PARA PRC TIEMPO REAL CON SYBR GREEN.

Se trabajó con 7 muestras en placas de 96 pozos (Thermo Fisher Scientific), en las cuales se colocaron en cada uno: 7 picomoles/microlitro del oligo sense, 5 picomoles/microlitro del oligo antisense de los genotipos VPH-16, -18 y -31, 5 microlitros de SYBR Green (Real-time PCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific), 50 nanogramos/microlitro de DNA extraído de las muestras y se ajustó a 10 uL de volumen final con H₂O estéril y un NTC (control negativo).

Se colocó la placa en el equipo de qPCR tiempo real (StepOne Real-Time PCR System, Thermo Fisher Scientific) y se programó a las siguientes condiciones que se muestran en el cuadro 4.

En la figura 24, se observan los NTC de los 3 tipos virales a los cuales no tuvieron una amplificación correcta.

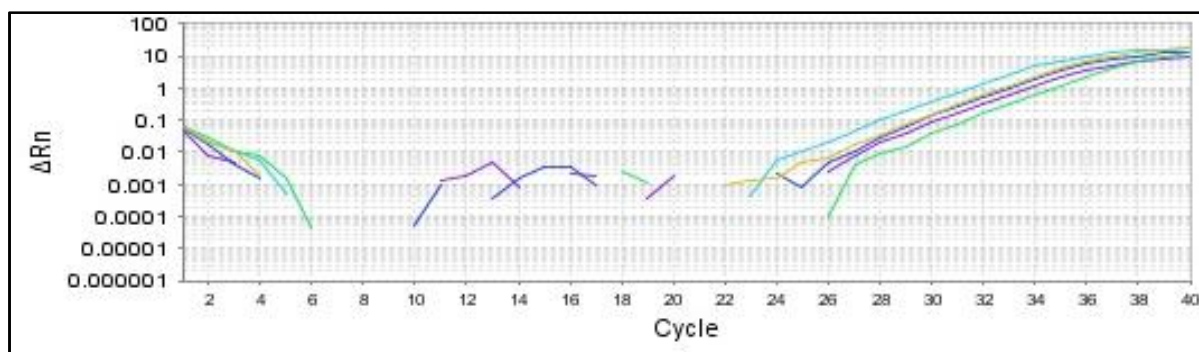
Figura 24. Controles negativos de la amplificación a los genotipos virales del VPH



Fuente: Directa

En la figura 25 se observan las muestras a las cuales las 7 dieron positivas al genotipo VPH-16, de acuerdo a la amplificación de los Cts.

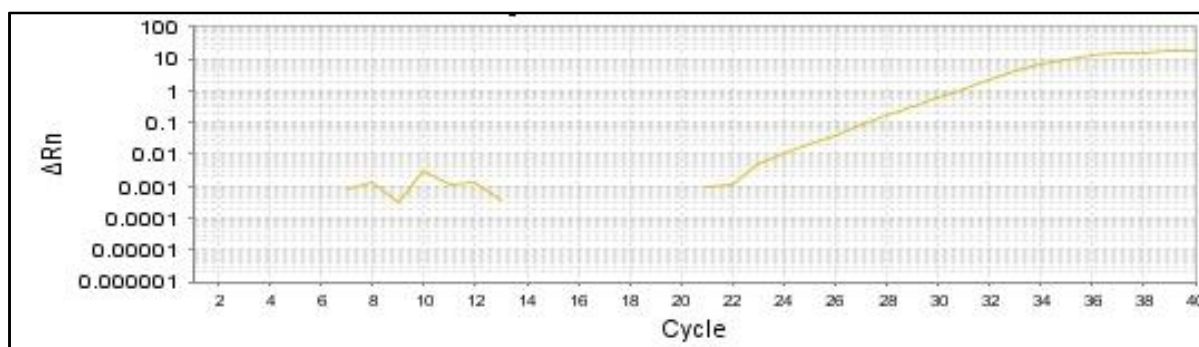
Figura 25. Muestras amplificadas para VPH 16



Fuente: Directa

En la figura 26 se observan las muestras a las cuales sólo 1 dio positiva al genotipo VPH-18, de acuerdo a la amplificación de los Cts.

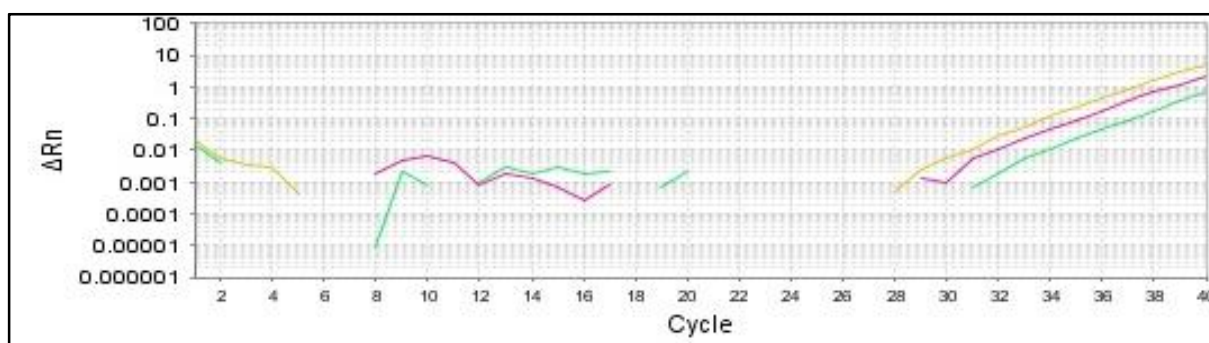
Figura 26. Muestras amplificadas para VPH 18



Fuente: Directa

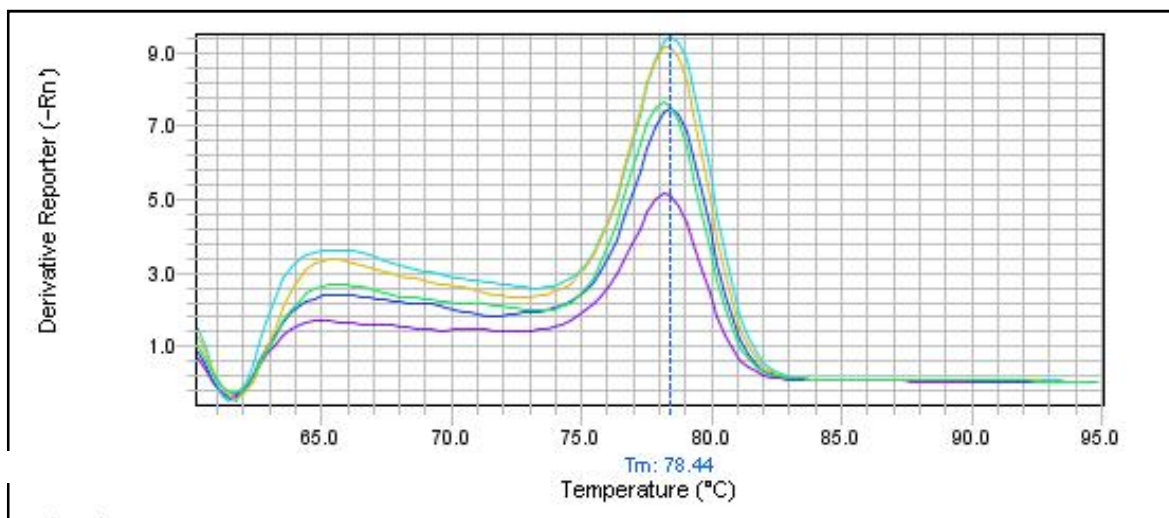
En la figura 27 se observan las muestras a las cuales sólo 3 dieron positivas al genotipo VPH-31, de acuerdo a la amplificación de los Cts.

Figura 27. Muestras amplificadas para VPH 31



De las 7 muestras positivas para EVPH-16 se puede identificar un solo pico el cual representa que los oligos están amplificando a su gen diana a una temperatura de aproximadamente de 78.44°C (figura 28).

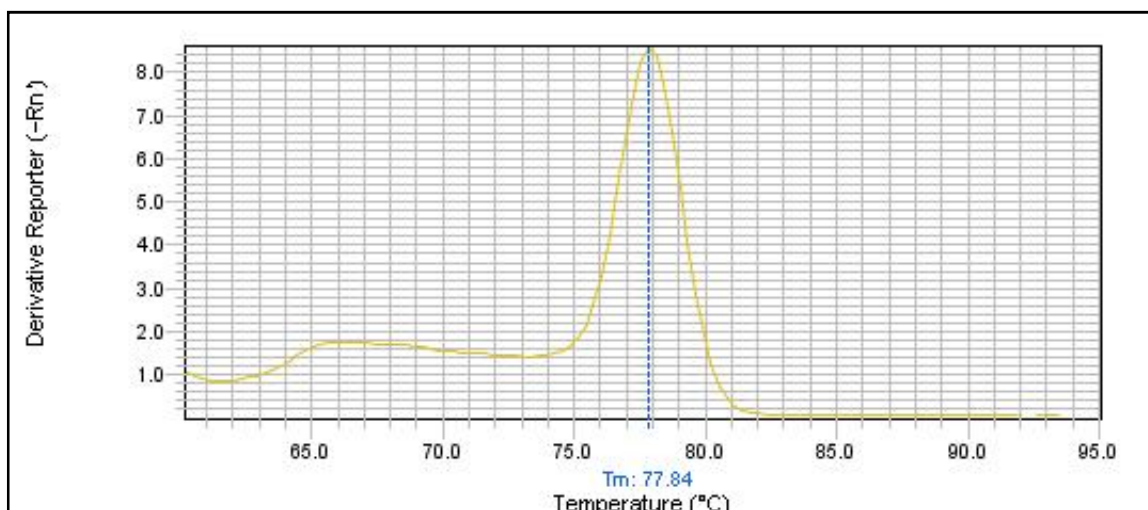
Figura 28. Curva de melting de muestras positivas para VPH-16.



Fuente: Directa

De la única muestra positiva para EVPH-18 se puede identificar un solo pico el cual representa que los oligos están amplificando a su gen diana a una temperatura de aproximadamente de 77.84°C (figura 29).

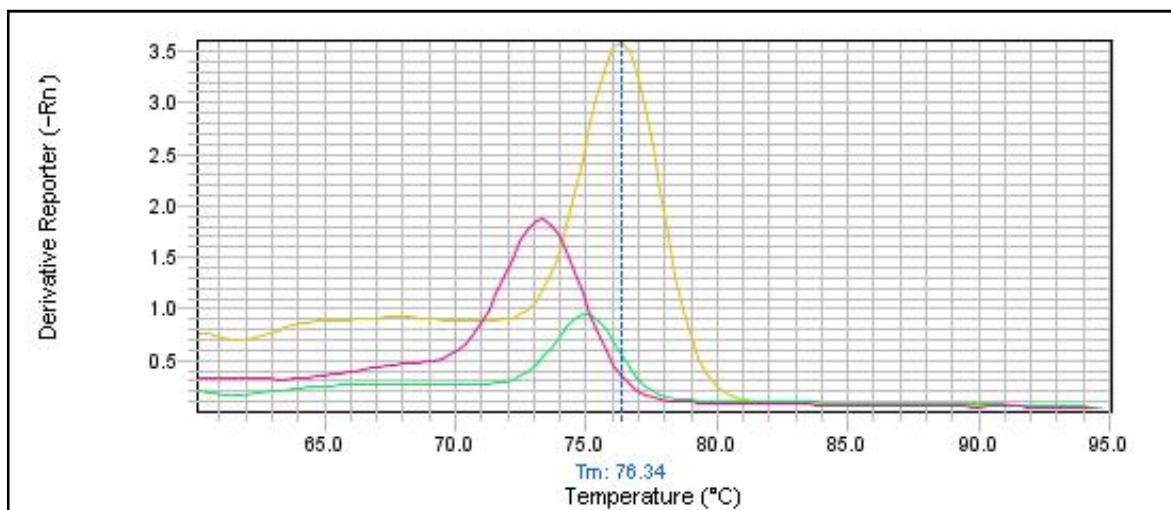
Figura 29. Curva de melting de muestras positivas para VPH-18



Fuente: Directa

De las 3 muestras positivas para EVPH-31 se puede identificar un solo pico el cual representa que los oligos están amplifican a su gen diana a una temperatura de aproximadamente de 76.34°C (figura 30).

Figura 30. Curva de melting de muestras positivas para VPH-31.



Fuente: Directa

Estos datos se corroboran con el número de Cts que confirman la amplificación a los genotipos de VPH-16, -18 y 31 (Cuadro).

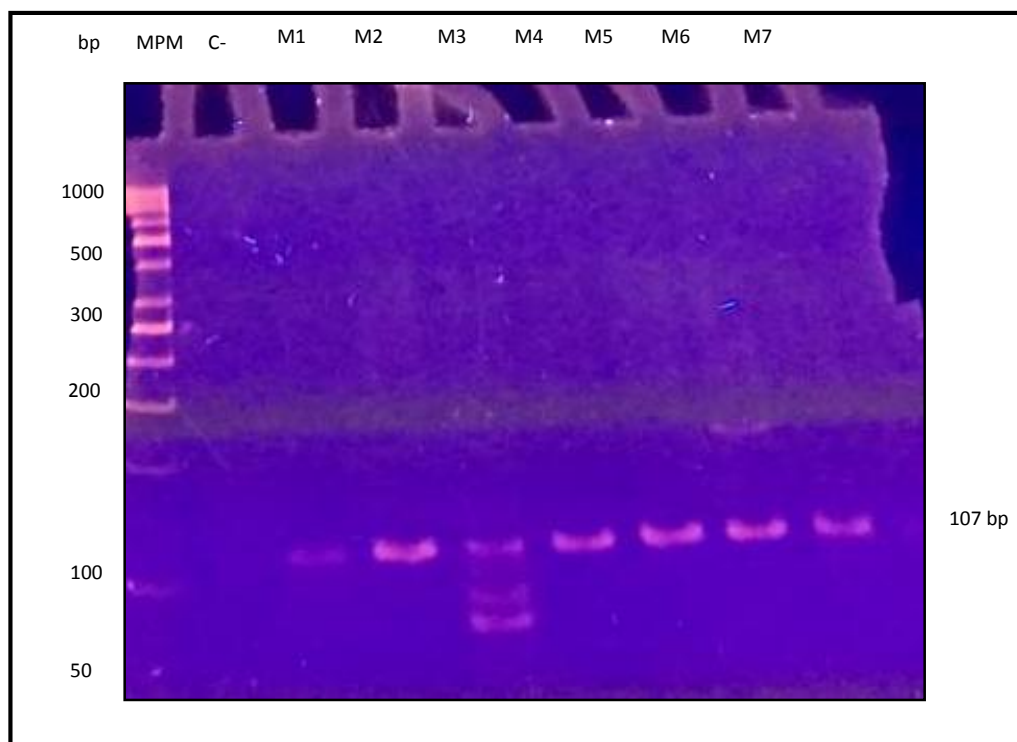
Figura 31. Número de Cts positivos para los genotipos de VPH-16, -18 y -31.

| Muestra | Ct | Muestra | Ct | Muestra | Ct |
|--------------|-------------------|--------------|--------------------|--------------|-------------------|
| NTC16 | Indeterminado | NTC18 | Indeterminado | NTC 31 | Indeterminado |
| CaCu invasor | 33.23748 | CaCu invasor | 32.92776489 | CaCu invasor | 34.176651 |
| CaCu invasor | 34.17665 | CaCu invasor | Indeterminado | CaCu invasor | Indeterminado |
| CaCu invasor | 35.08129 | CaCu invasor | Indeterminado | CaCu invasor | 37.1575203 |
| CaCu invasor | 31.8745575 | CaCu invasor | Indeterminado | CaCu invasor | Indeterminado |
| CaCu invasor | 33.33956 | CaCu invasor | Indeterminado | CaCu invasor | Indeterminado |
| CaCu in situ | 34.08419 | CaCu in situ | Indeterminado | CaCu in situ | Indeterminado |
| CaCu in situ | 31.98242 | CaCu in situ | Indeterminado | CaCu in situ | 35.1347198 |

Fuente: Directa

Se corrió un gel de acrilamida al 6%, teñido con bromuro de etidio para corroborar la amplificación de las muestras positivas al genotipo -16, en el cual se observa en el primer carril el MPM de 50 bp, en el segundo carril el control negativo (C-) y finalmente las muestras (M) con alguna lesión cervical, las cuales amplificaron a 107 bp (figura .

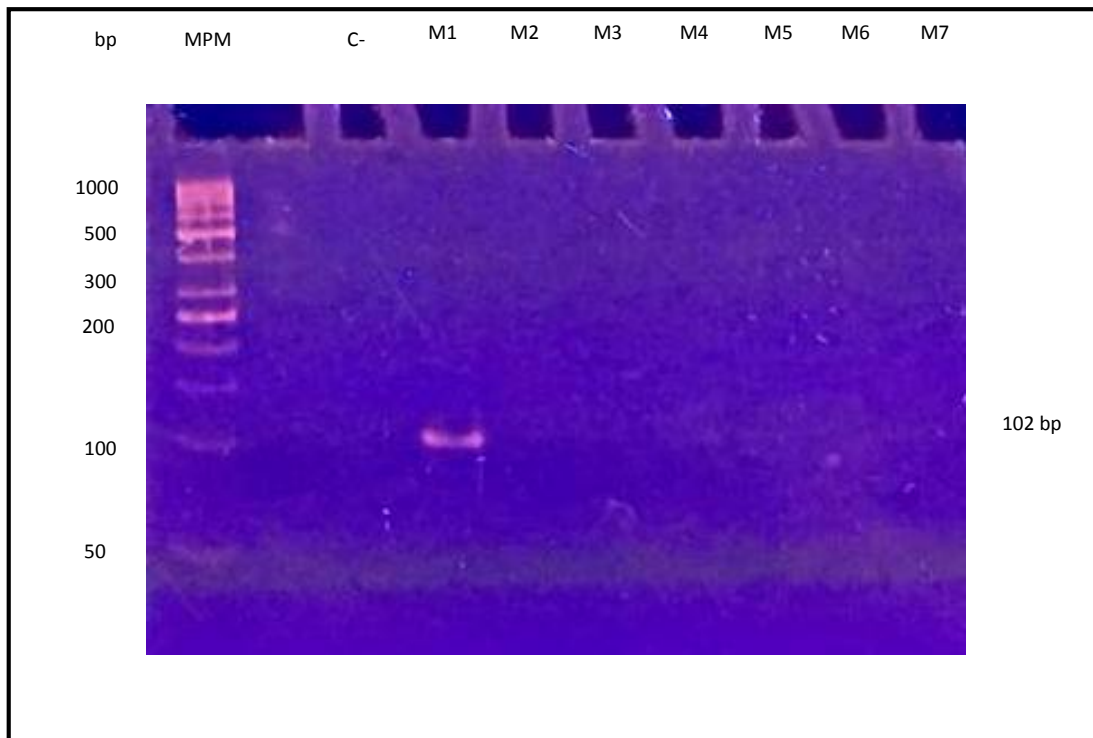
Figura 32. Producto de amplificación para genotipo de VPH-16.



Fuente: Directa

Se corrió un gel de acrilamida al 6%, teñido con bromuro de etidio, para corroborar la amplificación de las muestras positivas al genotipo -18, en el cual se observa en el primer carril el MPM de 50 bp, en el segundo carril el control negativo (C-) y finalmente las muestras (M) con alguna lesión cervical (figura 33).

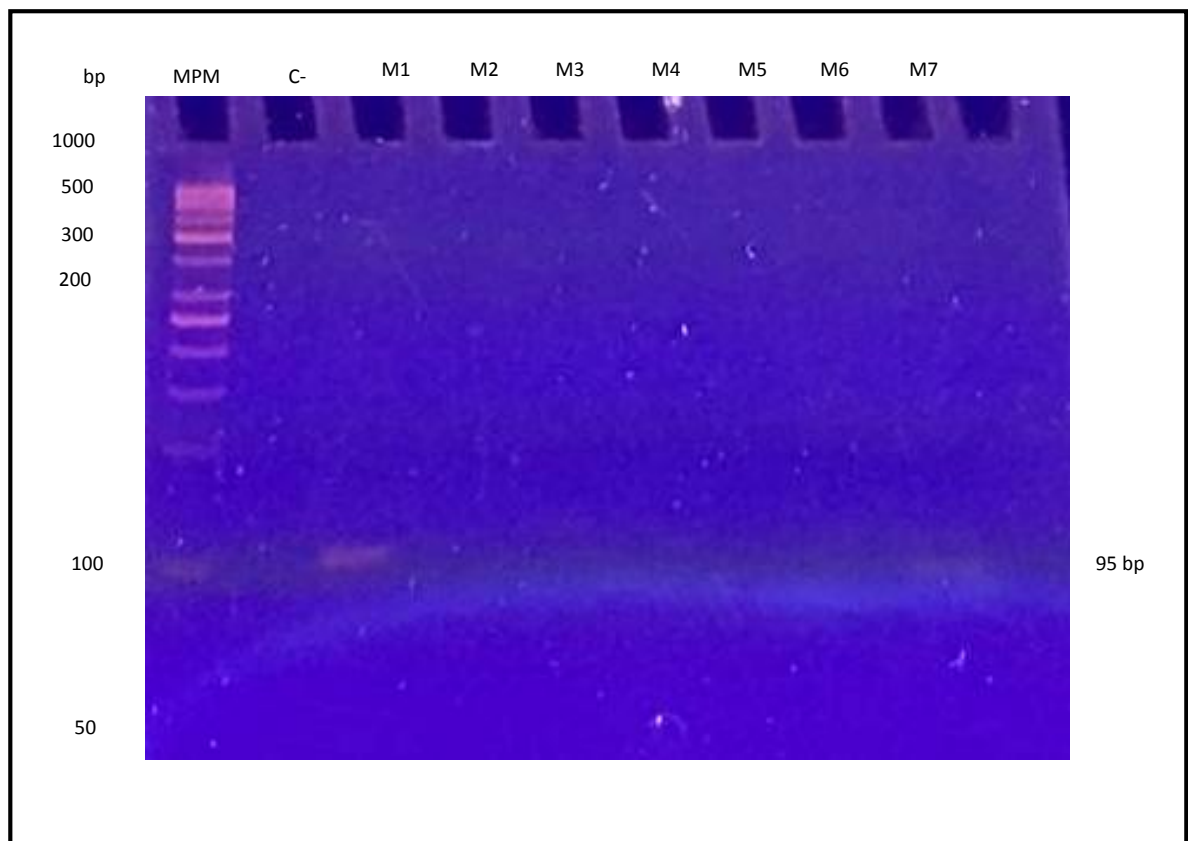
Figura 33. Producto de amplificación para genotipo de VPH-18.



Fuente: Directa

Se corrió un gel de acrilamida al 6%, teñido con bromuro de etídio, para corroborar la amplificación de las muestras positivas al genotipo -31, en el cual se observa en el primer carril el MPM de 50 bp, en el segundo carril el control negativo (C-) y finalmente las muestras (M) con alguna lesión cervical (figura 34).

Figura 34. Producto de amplificación para genotipo de VPH-31.



Fuente: Directa



**ANEXO 6
RECURSOS FINANCIEROS**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE ENFERMERÍA Y NUTRICIÓN
MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA**

| RECURSOS MATERIALES | UNIDAD | PRECIO UNITARIO | PRECIO |
|---|---------------------------|------------------------|------------------|
| Puntas de 1 | 1 paquete con 1000 piezas | \$250 | \$250 |
| Puntas de 10 | 1 paquete con 1000 piezas | \$166.62 | \$166.62 |
| Puntas de 1000 | 1 paquete con 1000 piezas | \$243.60 | \$243.60 |
| Gradillas | 3 gradillas | \$66.20 | \$198.60 |
| Microtubos de Eppendorf de 1.5 | 1 paquete con 500 piezas | \$411 | \$411 |
| Kit de extracción de DNA | 1 kit | \$3,742.75 | \$3,742.75 |
| Kit de PCR tiempo real | 1 kit | \$9,521 | \$9,521 |
| PIKO pcr placa clara de 96 pozos con 200 unidades | 1 paquete | \$10,628.19 | \$10,628.19 |
| Película selladora para PIKOREAL 100 sellos | 1 paquete | \$2,237 | \$2,237 |
| Aplicador para sellos adhesivos | 1 paquete | \$230.63 | \$230.63 |
| Etanol 70% | 1 garrafa | \$163 | \$163 |
| Agua destilada | 1 garrafa | \$216 | \$216 |
| Caja de guantes grande | 3 cajas | \$196.14 | \$588.42 |
| Parafilm | 1 paquete | \$597.93 | \$597.93 |
| Porta objetos sencillos | 3 paquete con 50 piezas | 22.76 | \$68.28 |
| Cubre objetos sencillos | 2 paquete con 100 piezas | \$23.20 | \$46.40 |
| Piko Real | 1 equipo | \$388,206 | \$388,206 |
| | | TOTAL | \$417,515 |



ANEXO 7.

Cronograma de actividades para el proyecto de investigación de “VARIABILIDAD DEL DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO A LA EXAMINACIÓN DE DIFERENTES NIVELES EN EL BLOQUE DE PARAFINA DE BIOPSIA DE IVPH, NIC Y CACU” 2016-2018.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE ENFERMERÍA Y NUTRICIÓN
MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA**

| Actividades | 2016 | | | | 2017 | | | | | | 2018 | | | |
|---|------|-----|-----|-----|---------|-------------|-------------|---------|---------|---------|---------|-------------|-------------|---------|
| | Sep | Oct | Nov | Dic | Ene-Feb | Mar- Abr | May- Jun | Jul-Ago | Sep-Oct | Nov-Dic | Ene-Feb | Mar- Abr | May- Jun | Jul-Ago |
| Revisión y Selección Bibliográfica | | | | | | | | | | | | | | |
| Elaboración del protocolo de investigación | | | | | | | | | | | | | | |
| Seminario de tesis | | | | | | | | | | | | | | |
| Comité de la MSP | | | | | | | | | | | | | | |
| Comité de ética de la Facultad de Enfermería UASLP | | | | | | | | | | | | | | |
| Prueba Piloto | | | | | | | | | | | | | | |
| Seminario de tesis | | | | | | | | | | | | | | |
| Comité de investigación del Hospital General de Soledad | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Recolección de muestras | | | | | | | | | | | | | | |
| Procesamiento de las muestras | | | | | | | | | | | | | | |
| Captura y descripción de datos | | | | | | | | | | | | | | |
| Seminario de tesis | | | | | | | | | | | | | | |
| Análisis y discusión de datos | | | | | | | | | | | | | | |
| Elaboración de informe de proyecto | | | | | | | | | | | | | | |
| Redacción del artículo | | | | | | | | | | | | | | |
| Seminarios de tesis | | | | | | | | | | | | | | |
| Presentación de examen profesional | | | | | | | | | | | | | | |




ANEXO 8
CARTA DE NO CONFLICTO DE INTERESES
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE ENFERMERÍA Y NUTRICIÓN
MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA




El que suscribe Lic. Enf. Edgar Villegas Hinojosa alumno del Posgrado de la Maestría en Salud Pública de la Facultad de Enfermería y Nutrición de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí manifiesta que es el autor principal del presente trabajo titulado: "SENSIBILIDAD DEL DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO POR AUMENTO DE CORTES A DIFERENTES NIVELES EN EL BLOQUE DE PARAFINA DE NIC Y CACU" bajo la dirección de la Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana y la co-asesoría de la Dra. Verónica Gallegos García, Dra. Yolanda Terán Figueroa y el Dr. Cuauhtémoc Oros Ovalle.


Declaran que no tienen ninguna situación de conflicto de intereses real, potencial o evidente, incluyendo ningún tipo de interés financiero o de otro tipo, especificando esto en el apartado de Consideraciones Éticas.



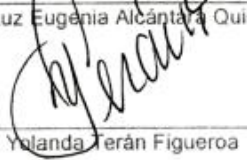
Lic. Enf. Edgar Villegas Hinojosa




Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana



Dra. Verónica Gallegos García



Dra. Yolanda Terán Figueroa



Dr. Cuauhtémoc Oros Ovalle



ANEXO 9
CARTA DE DERECHOS DE AUTORIA Y COAUTORIA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE ENFERMERÍA Y NUTRICIÓN
MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA

A quien corresponda

A través del presente nos permitimos informar para los involucrados en el protocolo de investigación titulado: "SENSIBILIDAD DEL DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO POR AUMENTO DE CORTES A DIFERENTES NIVELES EN EL BLOQUE DE PARAFINA DE NIC Y CACU" no tienen conflicto de interés considerando desde la generación del presente proyecto hasta la publicación de resultados que de él se generen

Se dará el debido crédito a los participantes como autor principal corresponde al Lic. Enf. Edgar Villegas Hinojosa como co-autores a la Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana, Dra. Verónica Gallegos García, Dra. Yolanda Terán Figueroa y al Dr. Cuauhtémoc Oros Ovalle, por lo que todos tendrán obligaciones éticas con respecto a la publicación de los resultados de investigación y serán responsables de la integridad y exactitud de los informes, además de aceptar en común acuerdo las normas éticas de la entrega de información para lo cual será necesario la publicación de los resultados negativos y positivos, mismos que podrán estar a disposición del público en general.

Exponemos que para la publicación del primer artículo será el Lic. Enf. Edgar Villegas Hinojosa compartiendo la coautoría con la Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana, Dra. Verónica Gallegos García y a la Dra. Yolanda Terán Figueroa como segundo, tercero y cuarto autor de acuerdo a su grado de participación en el artículo

Para los siguientes artículos la autoría principal se decidirá por consenso teniendo como criterio principal la contribución que realicen cada uno de los involucrados para ir como primer autor, así como otorgar el financiamiento de las publicaciones u otros productos derivados, tales como carteles o trabajos de difusión, teniendo siempre en cuenta el acuerdo previo del autor principal. Se acepta estar de acuerdo con lo estipulado en el presente documento.



Lic. Enf. Edgar Villegas Hinojosa



Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana



Dra. Verónica Gallegos García



Dra. Yolanda Terán Figueroa



Dr. Cuauhtémoc Oros Ovalle