

Presencia de lesiones preinvasoras e invasoras de cérvix, relación con el virus papiloma humano y factores epidemiológicos en Mérida, Venezuela

Presence of preinvasive and invasive cervical lesions, related to human papilloma virus and epidemiological factors in Mérida, Venezuela

Luis Eduardo Téllez Gil.^{1*}, Elvia María Michelli Viña^{1,2}, Diana Estela Callejas Monsalve³, Mike Telemaco Contreras Colmenares¹, María Eugenia Cavazza Porro⁴ y María Correnti de Plata⁵

¹Dpto. de Microbiología. Laboratorio de Microbiología y Salud Pública. Universidad de Los Andes, Estado Mérida, Venezuela.

²Escuela de Ciencias. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Estado Sucre, Venezuela.

³Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Estado Zulia, Venezuela.

⁴Instituto de Biomedicina, Ministerio del Poder Popular para la Salud.

⁵Instituto de Oncología y Hematología, Ministerio del Poder Popular para la Salud.

*letellezenator@gmail.com

Artículo original

Recibido:28-09-2017

Aprobado:23-02-2018

Resumen

Las lesiones de cérvix se han asociado a infección por Virus Papiloma Humano (VPH). 300 mujeres mayores de quince años que acudieron al Hospital Universitario de Los Andes (HULA), fueron estudiadas para identificar lesiones, detectar y tipificar VPH, y determinar factores asociados. Se realizó citología, colposcopia, cepillados cervicales utilizando (DNA *collection device Digene*[®]) y biopsias en los casos pertinentes. Se aisló el ADN mediante (QIAamp DNA Mini Kit QIAGEN[®]), siendo cuantificado y almacenado a -20 °C. Se detectó VPH por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de regiones L1 y E6/E7. La genotipificación por PCR anidada múltiple E6/E7, *C. trachomatis* se detectó por PCR. El VPH se detectó en 35 % (105) muestras, 88,46 % (92/105) fueron positivas para al menos uno de los genotipos evaluados. VPHAR se encontraron en 97,82 %, (90/92), VPH18 en 82 % (74/90), VPH16 en 44 % (40/90). 56,52 % (52/92) correspondieron a infecciones múltiples, VPH18/16 (20/52) fue la más frecuente. *C. trachomatis* se detectó en 9 % (27/300) pacientes. La citología mostró cambios sugestivos de infección en solo 16,35 % de las pacientes VPH positivas. 17/18 biopsias sugirieron infección viral y fueron positivas para VPH AR por biología molecular (94,44 %). La colposcopia sugirió infección viral en 46,15 %. El 66,34 % de pacientes fueron menores de 35 años. Se encontró relación estadísticamente no significativa entre infección por VPH, número de parejas sexuales, coinfección con *C. trachomatis* y hábito tabáquico. Estos resultados muestran elevada frecuencia de infección por VPH AR, asociada a factores epidemiológicos, cuyo diagnóstico certero y tratamiento oportuno son claves en la prevención de su transmisión y del desarrollo de lesiones en cérvix.

Palabras clave: Cáncer cervical, virus papiloma humano, reacción en cadena de la polimerasa.

Abstract

Cervical lesions have been associated with infection by Human Papilloma Virus (HPV). Three hundred women older than 15 years old who attended at the Hospital Universidad de Los Andes (HULA), were studied to identify lesions, detect and typify HPV, and determine associated factors. Cytology, colposcopy, cervical brushing using (DNA collection device Digene®) and biopsies were performed in the pertinent cases. DNA was isolated by (QIAamp DNA Mini Kit QIAGEN®), being quantified and stored at -20 ° C. HPV was detected by Polymerase Chain Reaction (PCR) of regions L1 and E6 / E7. The genotyping by multiple nested PCR E6 / E7, *C. trachomatis* was detected by PCR. HPV was detected in 35% (105) samples, 88.46% (92/105) were positive for at least one of the genotypes evaluated. VPHAR were found in 97.82% (90/92), HPV18 in 82% (74/90), HPV16 in 44% (40/90). 56.52% (52/92) corresponded to multiple infections, HPV18 / 16 (20/52) was the most frequent. *C. trachomatis* was detected in 9% (27/300) patients. The cytology showed changes suggestive of infection in only 16.35% of the HPV positive patients. 17/18 biopsies suggested viral infection and were positive for ARV HPV by molecular biology (94.44%). Colposcopy suggested viral infection in 46.15%. 66.34% of patients were under 35 years old. A statistically non-significant relationship was found between HPV infection, number of sexual partners, coinfection with *C. trachomatis* and smoking habit. These results show high frequency of infection by HPV AR, associated with epidemiological factors, whose accurate diagnosis and timely treatment are key in the prevention of its transmission and the development of lesions in the cervix.

Keywords: Cervical cancer, human papilloma virus, polymerase chain reaction.

Introducción

El doctor Harald zur Hausen, propuso que el cáncer cervical (CC) podría ser causado por infecciones con el virus identificado en los condilomas acuminados¹. En el año 2009, al Dr. zur Hausen se le otorgó el Premio Nobel de Medicina por esta novedosa idea, y por demostrar la presencia del genoma de VPH en tejido de CC².

La infección cervical por genotipos VPH de alto riesgo oncogénico (VPH AR), está estrechamente ligada al diagnóstico de precursores citopatológicos pre-invasivos, virtualmente, todos los casos de CC invasivo diagnosticados alrededor del mundo, contienen ADN de los mismos 13 genotipos de VPH AR³. Existe evidencia sólida que relaciona la infección por VPH con la oncogénesis directa inducida fundamentalmente por los genotipos de VPH AR VPH16 y 18⁴⁻⁸; por lo tanto, dichas infecciones son consideradas el principal factor de riesgo asociado al desarrollo de lesiones cervicales de alto grado, y a la producción de cáncer invasivo de células escamosas; estimándose que aproximadamente entre el 10,00 % y 20,00 % de las mujeres infectadas por VPH AR, eventualmente mostrarán la progresión de lesiones intraepiteliales de bajo grado a las de alto grado y a CC^{6,9,10}.

Hoy por hoy, el CC representa el segundo tipo de cáncer en la población femenina a nivel mundial, constituyendo una causa importante de morbilidad y mortalidad, con una incidencia de aproximadamente 500.000 nuevos casos y 280.000 defunciones al año; alrededor del 83,00 % de estos casos afecta a mujeres que residen en países en desarrollo, donde el CC totaliza el 15,00 % de las neoplasias diagnosticadas en la

población femenina^{10,11}. Anualmente, la región de las Américas notifica cerca de 92.136 casos de CC y 37.640 defunciones por esta enfermedad; sin embargo, existen importantes disparidades subregionales, dado que la incidencia y mortalidad por CC en América Latina y el Caribe son aproximadamente cuatro a cinco veces mayores que las de América del Norte¹². De acuerdo a las estadísticas del Registro Nacional de Tumores del Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) de Venezuela, el CC es la segunda causa de muerte en las mujeres venezolanas entre 15 y 76 años de edad; además se ha reportado que, en nuestro país, cada año se diagnostican aproximadamente 4.000 casos de CC y 1.700 mujeres mueren por esta patología^{10,13}.

Estudios realizados en el transcurso de los últimos diez años, han mostrado que la prevalencia de la infección por VPH en Venezuela es superior al 25,00 %, tanto en mujeres asintomáticas para patología cervical como en las que tienen algún grado de anormalidad citológica diagnosticada¹⁴⁻¹⁶. Así mismo, en la población venezolana se han identificado numerosos cofactores asociados al riesgo de adquisición de infecciones por VPH, y su progresión a lesiones cervicales premalignas y malignas, como otras ITS, el uso de anticonceptivos orales por más de 5 años, hábito tabáquico y elevada paridad (5 embarazos a término o más)^{17,18}. El presente estudio tuvo como objetivo detectar y genotipificar la infección por VPH, evaluar su asociación con lesiones preinvasoras e invasoras de cérvix, el estudio citológico y colposcópico, así como la presencia de factores asociados: ITS: *Chlamydia trachomatis*, hábito tabáquico, número de parejas sexuales en el estado Mérida, Venezuela.

Materiales y métodos

Se seleccionaron al azar 300 mujeres con edades comprendidas entre 15 y 69 años de edad, sexualmente activas o que habían iniciado actividad sexual, que asistieron a la consulta de ginecología del Hospital Universitario de Los Andes (HULA) de la ciudad de Mérida estado Mérida en Venezuela, durante el lapso agosto 2007-agosto 2012. Se incluyeron mujeres sometidas a una rutina de despistaje de cáncer de cuello uterino, excluyéndose a las que, para el momento de la entrevista y toma de muestras, presentaron sangrado genital por menstruación normal, metrorragia o menorragia, y a las que presentaron cambios en el cuello uterino debidos a procedimientos quirúrgicos que impidieron la correcta toma de muestra, mujeres con embarazo diagnosticado y mujeres seropositivas por VIH, o bajo tratamiento inmunosupresor. Se les aplicó un instrumento de recolección de datos, para recabar información concerniente a su estatus socio-económico y cultural, así como sus hábitos de salud sexual y reproductiva. La información recolectada fue procesada en una estructura de base de datos en el programa EPI Info 2012, versión 7.0.

Toma de muestras

Se realizó evaluación ginecológica por especialistas; el reporte de este estudio se registró en una ficha clínica diseñada para tal fin, se tomaron hisopados exocervicales y endocervicales con hisopos estériles, para el posterior estudio citológico en el Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina, ULA, Mérida. Escobillados de exocérvix, endocérvix y la zona de transformación empleando el estuche DNA *collection device* (*Digene® Corporation*); estas se utilizaron para la detección y

genotipificación de la infección por VPH, y detección de *Chlamydia trachomatis*, por la aplicación de técnicas moleculares.

Las muestras se trasladaron para su procesamiento al laboratorio, realizándose aislamiento de ADN a partir de las diferentes muestras cervicales obtenidas, mediante QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN®), de acuerdo con las instrucciones del laboratorio fabricante, para las muestras obtenidas por escobillado los tubos se descongelaron y, al alcanzar la temperatura ambiente de 15 a 25 °C, fueron mezclados en *Vortex* por 1 minuto. Luego, se retiró el escobillón y se transfirieron 200 µL de muestra a un tubo Eppendorf estéril de 1,50 µL de capacidad, al cual se agregó 20 µL de solución stock de proteinasa K y 200 µL de buffer AL (buffer de lisis). Se mezcló en *Vortex* por 15 segundos. Después de la incubación durante 10 minutos a 56 °C, el tubo se centrifugó brevemente y añadió 200 µL de etanol puro (96,00-100,00 %). Se mezcló en *Vortex* durante 15 segundos y centrifugó brevemente. La mezcla resultante fue transferida a la columna de aislamiento, en un tubo de colección de 2 µL de capacidad, se centrifugó por 1 minuto a 8.000 rpm y transfirió la columna a un nuevo tubo de colección de 2 µL de capacidad. La columna se abrió y agregó 500 µL de buffer AW1, luego fue centrifugada por 1 minuto a 8.000 rpm. La columna fue transferida a un nuevo tubo de colección de 2 µL de capacidad y el tubo conteniendo el filtrado se descartó. Al sedimento contenido en la columna fue añadido 500 µL de buffer AW2; y se centrifugó por 3 minutos a 14.000 rpm; el paso se repitió dos veces. La columna fue transferida a un nuevo tubo de colección estéril, de 1,50 µL de capacidad. Se abrió y se agregó 200 µL de buffer AE (buffer de elusión) o agua destilada, luego fue incubada durante 1 minuto a temperatura ambiente, y se centrifugó durante 1 minuto a 8.000 rpm. La columna fue extraída y descartada, el eluido que contiene el ADN extraído fue conservado a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), amplificación de los fragmentos de ADN de VPH específicos por *nested-PCR* de la región génica viral L1

Se utilizó los pares de iniciadores consenso o generales MY09/MY11 y GP5+/GP6+^{14,20}. Se amplifica un fragmento de aproximadamente 450 pb de largo, el cual se encuentra en una región conservada del gen estructural/1; mientras que el par interno GP5+/GP6+ amplifica un fragmento de aproximadamente 150 pb dentro de la secuencia amplificada por el par MY09/MY11¹⁹.

Primera reacción:

Iniciadores

Se utilizaron los iniciadores MY09 (secuencia 5'-3': DNA-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC) y MY11 (secuencia 5'-3': DNA- GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG) ²⁰. Para la mezcla de reacción se utilizó 10 µL de HotStarTaq® Master Mix 2X (QIAGEN®), 400 nM de cada oligonucleótido y 100 ng de ADN blanco.

Control VPH positivo

Oligonucleótido de ADN-VPH comercial, HPV-C001, de *Maxim Biotech, Inc.*

Control interno de la reacción

Para este control se amplificó simultáneamente con el fragmento de ADN específico para VPH, un fragmento de aproximadamente 248 bp del gen de la β-globina humana ²¹.

Perfil térmico

Inició con un paso de desnaturalización a 94 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos: desnaturalización 94 °C por 1 minuto, apareamiento o hibridación a 55 °C por 1 minuto y extensión a 72 °C por 1 minuto; y un paso de extensión final a 72 °C por 5 minutos (96).

Segunda PCR

Iniciadores: Se utilizaron los iniciadores GP5+ (secuencia 5'-3': DNA-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC) y GP6+ (secuencia 5'-3': DNA- GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C)²². Para la mezcla de reacción se utilizó 10 µL de HotStarTaq® Master Mix 2X y 400 nM de cada iniciador; como ADN blanco se tomó 2 µL a partir de la dilución 1/10 del producto de la PCR MY09/MY11, en un volumen final de reacción de 20 µL.

Control VPH positivo

Oligonucleótido de ADN-VPH comercial, HPV-C001, (Maxim Biotech, Inc).

Perfil térmico

Inició con un paso de desnaturalización a 94 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos: desnaturalización 94 °C por 1 minuto, apareamiento o hibridación a 40 °C por 2 minutos y extensión a 72 °C por 1,5 minutos; y un paso de extensión final a 72 °C por 4 minutos²³.

Amplificación de los fragmentos de ADN VPH específicos por nested-PCR múltiple, región génica viral E6/E7

Esta técnica se aplicó para la detección y genotipificación de VPH. La PCR en formato nested-múltiple permitió la identificación de los genotipos virales de alto riesgo oncogénico VPH16, 18, 31, 33, 45, 52, 56 y 58, y de bajo riesgo VPH6/11²³.

Primera reacción. Detección de VPH utilizando los iniciadores GP-E6-3F/5B/6B

Se utilizaron los iniciadores GP-E6-3F (secuencia 5'-3': DNA-GGG WGK KAC TAG AAT CGG T), GP-E6-5B (secuencia 5'-3': DNA- CTG AGC TGT CAR NTA ATT GCT CA) y GP-E6-6B (secuencia 5'-3': DNA- TCC TCT GAG TYG YCT AAT TGC TC), los cuales amplifican un fragmento específico de ADN de VPH entre 602 pb y 666 pb²³. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µL, conteniendo 100 ng de ADN genómico total, 10 µL de HotStarTaq® Master Mix 2X y 400 nM de cada oligonucleótido.

Control VPH positivo

Oligonucleótido de ADN-VPH comercial, HPV-C001 (Maxim Biotech, Inc).

Control interno de la reacción

Para este control se amplificó simultáneamente con el fragmento de ADN específico para VPH, un fragmento de aproximadamente 248 pb del gen de la β-globina humana²¹.

Perfil térmico

Inició con un paso de desnaturalización a 94 °C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos: desnaturalización 94 °C por 1 minuto, apareamiento o hibridación a 55 °C por 1 minuto y extensión a 72 °C por 1 minuto; y un paso de extensión final a 72 °C por 10 minutos [modificado de Sotlar y col.²³].

Segunda reacción. Identificación de los genotipos de VPH de alto y bajo riesgo oncogénico por nested-PCR-múltiple

Las muestras que resultaron positivas para VPH, utilizando los iniciadores consenso, se analizaron por esta misma técnica con iniciadores específicos para los diferentes genotipos de VPH a identificar, los cuales se presentan en la Tabla 1.

Las reacciones de PCR, formato nested-múltiple se realizaron en dos tubos, en el primero se identificaron los genotipos de VPH AR VPH16, 18, 31 y 45; en el segundo se evaluó la presencia de los genotipos de VPH AR VPH33, 52, 56, 58, y de bajo riesgo oncogénico VPH6/11. El segundo ensayo de PCR (nested-múltiple) se realizó a partir del producto de la primera PCR, utilizando como blanco la región temprana E6/E7. Para la mezcla de reacción se utilizó 10 μ L de HotStarTaq® Master Mix 2X y 400 nM de cada oligonucleótido; como ADN blanco se tomó 2 μ L a partir de la dilución 1/10 del producto de la PCR GP-E6/E7, en un volumen final de 20 μ L.

Tabla 1. Genotipos de VPH de alto y bajo riesgo oncogénico.

VPH de alto riesgo oncológico			
Genotipo de VPH	Iniciador (Fwd)	Reverso (Rev)	Tamaño del ampliación (pb)
VPH16	CAC AGT TAT GCA CAG AGC TGC	CAT ATA TTC ATG CAA TGT AGG TGT A	457
VPH18	CAC TTC ACT GCA AGA CAT AGA	GTT GTG AAA TCG TCG TTT TTC A	322
VPH31	GAA ATT GCA TGA ACT AAG CTC G	CAC ATA TAC CTT TGT TTG TCA A	263
VPH33	ACT ATA CAC AAC ATT GAA CTA	GTT TTT ACA CGT CAC AGT GCA	398
VPH45	GTG GAA AAG TGC ATT ACA GG	ACC TCT GTG CGT TCC AAT GT	151
VPH52	TAA GGC TGC AGT GTG TGC AG	CTA ATA GTT ATT TCA CTT AAT GGT	229
VPH56	GTG TGC AGA GTA TGT TTA TTG	TTT CTG TCA CAA TGC AAT TGC	181
VPH58	GTA AAG TGT GCT TAC GAT TGC	GGT GTT ACA GGT TAC ACT TGT	274
VPH de bajo riesgo oncogénico			
VPH6/11	TGC AAG AAT GCA CTG ACC AC	TGC ATG TTG TCC AGC AGT GT	334

Controles VPH positivos

Se utilizó en cada reacción realizada en el tubo 1, dos oligonucleótidos de ADN-VPH comerciales, HPV-C001 para VPH16/18 y HPV-4011-18 para VPH18; en el tubo 2 se utilizaron los oligonucleótidos de ADN-VPH comerciales HPV-4009-33 y HPV-4012-11, todos de Maxim Biotech, Inc.

Perfil térmico

Inició con un paso de desnaturalización a 94 °C por 15 minutos, seguido de 35 ciclos: desnaturalización 94 °C por 30 segundos, apareamiento o hibridación a 56 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 45 segundos; y un paso de extensión final a 72 °C por 4 minutos [modificado de Sotlar y col.²³]. Todas las amplificaciones se procesaron en un Termociclador modelo ABI 2400 (Applied Biosystems). Los productos de reacción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,20%, con 10 mL de bromuro de etidio/100 mL de agar, y posterior iluminación con luz UV. En la corrida electroforética se

incluyó un marcador de peso molecular de 1.000 pb, escalera de 100 pb (100 bp DNA Ladder, Invitrogen) y el buffer 10X blue juice™ gel loaddin buffer (Invitrogen) para verificar el tamaño de las bandas obtenidas. Para la detección *C. trachomatis* en las muestras cervicales de las pacientes se aplicó la técnica de PCR, dirigida a la amplificación de un fragmento de aproximadamente 241 pb, de una secuencia genéticamente conservada de un plásmido críptico que contiene secuencias de ADN de *C. trachomatis*.

Aspectos éticos

El protocolo de trabajo fue evaluado y avalado por un comité de bioética, a las participantes se les solicitó su autorización mediante consentimiento informado para utilizar la información recabada y las muestras biológicas recolectadas. A todas las pacientes mayores de edad, y a los padres y/o representantes de las menores de edad, se les explicó acerca de la naturaleza e importancia del estudio, e informó que el mismo sería realizado siguiendo los principios establecidos por la Organización Mundial de la Salud para investigaciones médicas en seres humanos¹⁹.

Resultados y discusiones

En relación a la edad de las mujeres estudiadas, el 66,34% de pacientes positivas para la detección molecular de infección por el VPH fueron menores de 35 años de edad. En la Tabla 2 se presenta la frecuencia de detección molecular de VPH en mujeres del estado Mérida, Venezuela entre 2007 y 2012. Se puede apreciar que un 35 % (105/300) muestras analizadas fueron positivas para ADN de VPH.

Tabla 2. Frecuencia de detección molecular de VPH en mujeres. Mérida- Venezuela. 2007-2012*.

VPH	Número	Porcentaje
Sí	105	35
No	195	65
Total	300	100

*Laboratorio de Microbiología y Salud Pública. Facultad de Medicina. ULA. MPPS. Mérida

El porcentaje de detección de la infección viral obtenido a partir de los ensayos de biología molecular aplicados fue superior al registrado en la población general alrededor del mundo, (9,00-13,00 %); así mismo, el porcentaje de infecciones por VPH determinado contrasta con la estimación descrita por la OMS, la cual reportó para el año 2008 en América un 15,60 % en población general¹⁰. Otros trabajos describen en algunos países latinoamericanos que la prevalencia de la infección por VPH es superior al 25 %, tanto en mujeres asintomáticas para patología cervical como en las que tienen algún grado de anormalidad citológica diagnosticada¹⁴⁻¹⁶. Algunos autores han reportado prevalencias más elevadas, alrededor del 28 %²⁴. El elevado porcentaje de muestras VPH positivas encontradas en este estudio puede deberse a la naturaleza de las infecciones genitales por VPH, las cuales se transmiten principalmente por vía sexual, evento que favorece su alta transmisión en individuos sexualmente activos¹⁶. Investigaciones asociadas a la epidemiología del VPH muestran que la prevalencia de la infección varía dependiendo de

múltiples factores; tales como la demografía, las características de comportamiento de la población estudiada y el método de diagnóstico^{23,25,26}.

En la Tabla 3 se muestra la frecuencia de detección molecular de genotipos VPH y genotipos diferenciados en VPH-AR en mujeres. Mérida- Venezuela entre el 2007 y 2012. Se puede apreciar que el 88,46 % (92/105) de las muestras analizadas fueron positivas para al menos uno de los genotipos investigados. VPH-AR se encontraron en 97,82 % de las muestras que fueron positivas para genotipos evaluados en este estudio, reportándose así una elevada frecuencia de genotipos de VPH AR en la población estudiada.

Tabla 3. Frecuencia de detección molecular de genotipos VPH y genotipos diferenciados en VPH-AR en mujeres. Mérida- Venezuela. 2007-2012*.

VPH (genotipos)	Genotipos de VPH		Genotipos diferenciados en VPH-AR**	
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
Sí	92	88,46	90	97,82
No	13	11,54	2	2,18
Total	105	100	92	100

*Laboratorio de Microbiología y Salud Pública. Facultad de Medicina. ULA. MPPS. Mérida

** En 92 mujeres.

Por otra parte, en la Tabla 4 se presenta la frecuencia de genotipos de VPH-AR identificados por detección molecular en 90 mujeres del estado Mérida, Venezuela del 2007 al 2012, se observa que, dentro de los VPH de alto riesgo oncogénico, el VPH18 se encontró en 82 % (74/90), seguido por el VPH16 con un 44 % (40/90), otros genotipos mostraron frecuencias muy bajas. La distribución relativa de estos genotipos es similar a los datos publicados previamente en la ciudad de Mérida, Venezuela, en el cual se evidenció el predominio de infecciones por VPH18 sobre los otros genotipos evaluados²⁷. Estos genotipos virales están íntimamente asociados al riesgo de desarrollo de cáncer uterino y han sido reportados en el mundo, siendo el genotipo VPH16 más identificado^{5,12,28,29}.

Tabla 4. Frecuencia de genotipos de VPH-AR identificados por detección molecular en 90 mujeres. Mérida- Venezuela. 2007-2012*.

VPH	Número	Porcentaje
18	74	82,00
16	40	44,00
31	2	2,22
45	2	2,22
52	2	2,22
56	1	1,11
58	2	2,22

*Laboratorio de Microbiología y Salud Pública. Facultad de Medicina. ULA. MPPS. Mérida

Las pruebas de detección e identificación de VPH han demostrado ser un fuerte predictor de riesgo en el desarrollo de neoplasias cervicales, apoyando la hipótesis que la

identificación de estos virus estratifica efectivamente a las pacientes de acuerdo con el riesgo de cáncer cervical³⁰.

En la Tabla 5 se puede observar la frecuencia de infecciones por VPH únicas y mixtas en 92 mujeres en las que se detectó el ADN de este virus. Un 56,52 % de las pacientes presentó infección mixta por dos o más genotipos virales, mientras que un 43,48 % mostró infección por un solo genotipo viral. La combinación más frecuentemente encontrada fue VPH16/18 con un 38,46 % (20/52).

Tabla 5. Frecuencia de infecciones individuales y mixtas por genotipos de VPH en 92 mujeres. Mérida- Venezuela. 2007-2012*.

VPH	Número	Porcentaje
Infección única	40	43,48
Infección mixta	52	56,92
Total	92	100

*Laboratorio de Microbiología y Salud Pública. Facultad de Medicina. ULA. MPPS. Mérida

Existen evidencias que las infecciones múltiples por diferentes genotipos de VPH incrementan la probabilidad de adquirir un genotipo de alto riesgo³¹. El fenómeno de coinfección sugiere la presencia de una acción sinérgica entre los diferentes genotipos virales diagnosticados en una sola muestra³². Existen reportes de que la presencia de combinación de genotipos de alto riesgo en las pacientes aumenta el riesgo de cáncer cervical³³. En otras investigaciones realizadas al respecto, se sostiene que las implicaciones clínico-epidemiológicas de la infección con múltiples genotipos de VPH son inciertas. Esta afirmación está basada en estudios de seguimiento realizados en mujeres con infecciones por VPH múltiples, en las cuales se ha observado que, aunque los genotipos identificados tienden a formar grupos, el monitoreo de la infección en estas mujeres no muestra que estos grupos tengan una influencia determinante en el curso de la infección viral y el desarrollo de lesiones malignas en las pacientes afectadas³⁴.

La frecuencia general de infección por *C. trachomatis* fue del 9 %, 18 de los 27 casos positivos presentaron co-infección con VPH resultando una asociación estadísticamente no significativa ($p=0,3625$, test χ^2). La citología mostró cambios sugestivos de infección en solo 16,35 % de las pacientes VPH positivas, mientras que la colposcopia sugirió infección viral en 46,15 % de la población estudiada. El 85,00 % refirió tener una pareja en la actualidad. De las 105 mujeres que resultaron positivas para infección con VPH, el 26,8% refirió fumar, y un 73,2 % negó dicho hábito. No se encontró una relación estadísticamente significativa entre la detección de VPH y el hábito tabáquico (OR 1,4629, IC 95 % 0,8864-2,4065; $p=0,1420$, χ^2 corregido de Yates).

Las ITS representan un cofactor importante para la progresión de lesiones cervicales asociadas a infección por VPH, a grados severos³⁵. Se ha reportado que mujeres que cursan con infección de cuello uterino por VPH, suelen ser también positivas para infección por *C. trachomatis*, teniendo alto riesgo de desarrollar cáncer cervical³⁶. Estudios epidemiológicos han demostrado una mayor tasa de infección por *C. trachomatis* en pacientes con cáncer cervical³⁷. Este microorganismo se ha relacionado significativamente con un mayor riesgo de este tipo de cáncer en estudios prospectivos ($p < 0.001$), retrospectivos ($p < 0.001$), y se ha identificado como un factor predictivo

independiente de cáncer cervical en 11 estudios ($p < 0.04$). Según el tipo histológico ha mostrado un riesgo elevado para carcinoma de células escamosas ($p < 0.001$) y adenocarcinoma ($p < 0.001$). Es necesario ampliar la detección de infecciones por este microorganismo y tratar las mujeres en forma inmediata, particularmente aquellas con infecciones simultáneas con VPH, este enfoque no solo protegerá contra la enfermedad inflamatoria pélvica y la infertilidad, sino que también podría prevenir el cáncer de cuello uterino³⁷. En esta investigación no se evidenció asociación estadísticamente significativa entre el hábito de fumar y la presencia de infección por VPH, a pesar de que se ha demostrado que el fumar cigarrillos continuamente está asociado con un significativo, pero moderado incremento del riesgo de adquisición de una infección por VPH, su cronicidad, así como la probabilidad de que favorezca el desarrollo de malignidad en el tejido infectado³⁸.

Conclusiones

Los resultados anteriormente presentados demuestran que, en la población femenina de la ciudad de Mérida en Venezuela, hay un elevado porcentaje de infección por VPH y especialmente de alto riesgo oncogénico, así como una relación de la infección viral a cofactores clínico-epidemiológicos, los cuales contribuyen a elevar el riesgo de desarrollar lesiones cervicales, que pueden progresar y finalmente producir cáncer cervical.

Conflictos de interés

Los autores manifiestan no tener conflictos de interés.

Agradecimiento

Este trabajo recibió financiamiento de los proyectos FONACIT-G-2005000408 y Misión Ciencia LUZPROLAB N° 2007001088.

Referencias bibliográficas

1. Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers-a brief historical account. *Virology*. 2009; 384:260-65.
2. Burk R, Chen Z, Van Doorslaer K. Human Papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genom*. 2009; 12:281-90.
3. zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physic*. 1999; 111:581-87.
4. Campbell K. The infectious causes of cancer. *Nurs Times*. 2006;102:28-30.
5. Haghshenas M, Golini-Moghaddam T, Rafiee A, Emadeian O, Shykhpour A, Ashrafi GH. Prevalence and type distribution of high-risk human papillomavirus in patients with cervical cancer: a population-based study. *Infect Agents and Cancer*. 2013; 8(1):20.
6. Peralta-Zaragoza O, Deas J, Gómez-Cerón C, García-Suastegui WA, Fierros- Zárata GS, Jacobo-Herrera NJ. HPV-based screening, triage, treatment, and followup strategies in the management of cervical intraepithelial neoplasia. *Obst Gynecol Internat*. 2013. 912780.

7. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008; 110:S4-7.
8. Gravitt P. The known unknowns of HPV natural history. *J Clin Invest.* 2011; 121:4593-99.
9. Haverkos H. Multifactorial etiology of cervical cancer: a hypothesis. *Med Gen Med.* 2005; 7(4):57.
10. World Health Organization/Institut Català d'Oncologia. Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre), Human papillomavirus and related cancers in world [Internet]. Summary Report, WHO/ICO 2010. Recuperado a partir de: <http://www.who.int/hpvcentre>. Acceso 17 de agosto de 2011.
11. Castellsagué X, de Sanjosé S, Aguado T, Louie K, Bruni L, Muñoz J, et al. HPV and cervical cancer in the world. Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). 2007 Report [Internet]. WHO/ICO 2007. Recuperado a partir de: <http://www.who.int/hpvcentre>. Acceso 17 de agosto de 2011.
12. Vaccarella S, Herrero R, Dai M, Snijders P, Meijer C, Thomas J, et al. Reproductive factors, oral contraceptive use, and human papillomavirus infection: pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(11):2148-53.
13. Ministerio del Poder Popular para la Salud. MPPS avanza en los métodos de detección temprana del Cáncer de Cuello Uterino [Internet] MPPS 2013. Recuperado a partir de: <http://www.mpps.gov.ve>. Acceso 12 de septiembre de 2013.
14. Reigosa A, Alvarez M, De Vasconcelo M, Cristina R, Salas W, Rebolledo V, et al, Diagnóstico del virus papiloma humano en cuello uterino de mujeres que acuden a su consulta anual citológica. *Salus.* 2004; 8(1):26-31.
15. Correnti M, Cavazza M, Herrera O, Rodríguez A. Presence of human Papillomavirus infection determined by hybrid capture assay in cervical lesions in a Venezuelan Population. *Invest Clin.* 2010; 51: 27-35.
16. Contreras L, Correnti M, Ávila M, Guerrero A, León A. Virus Papiloma Humano (VPH) en contexto ecológico venezolano. (I): diagnóstico citológico y molecular. *Salud.* 2008; 12(3): 68-77.
17. Ferreiro M, Rodríguez M, Fernández J, Díaz J, Roye R. Análisis del comportamiento de las ITS en Venezuela durante los últimos 10 años. *Dermatol Venez.* 2004; 42(3): 38-42.
18. Núñez-Troconis J, Delgado M, González J, Mindiola R, Velásquez J, Conde B, et al. Prevalence and risk factors of human papillomavirus infection in asymptomatic women in a Venezuelan urban area. *Invest Clin* 2009; 50(2): 203-212.
19. Verteramo R, Pierangeli A, Mancini E, Calzolari E, Bucci M, Osborn J, et al, Human papillomaviruses and genital co-infections in gynaecological outpatients. *BMC Infec Dis.* 2009; 9:16.
20. Manos M, Ting Y, Wright D, Lewis A, Broker T, Wolinski S. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells.* 1989; 7:209-13.
21. Saiki R, Bugawan T, Horn G, Mullis K, Erlich H. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature.* 1986; 324:163-6.
22. de Roda A, Walboomers J, van den Brule A, Meijer C, Snijders P. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol.* 1995; 76(4):1057-62.

23. Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, et al. Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(7): 3176-3184.
24. Paz M, Fernández A, Amparán M, Azofra A, Martín Y, Ojugas S, et al. Prevalencia de genotipos del virus del papiloma humano de alto riesgo no vacunables dentro del programa de Detección Precoz de Cáncer de Cérvix en Cantabria. *Aten Primaria.* 2016;48(6):347-355.
25. Trottier H, Burchell A. Epidemiology of mucosal human Papillomavirus infection and associated diseases. *Public Health Genomics.* 2009;12(5-6):291-307.
26. López A, Lizano M. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología.* 2006 (1): 31 – 55.
27. Muñoz M, Mendoza JA, Téllez L, Noguera M, Moret O, López M, et al. Detección de VPH-16 y 18 en muestras de cérvix de mujeres que acuden a centros asistenciales de la ciudad de Mérida, Venezuela. *Rev. Biomed.* 2003; 14: 61-68.
28. Clifford G, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders P, Vaccarella S, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International agency for research on cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet.* 2005;366(9490):991-8.
29. Conesa Z, Ortiz R, Moya B, Doménech P, Orantes C, Pérez-Guillermo M, et al. Genotype distribution of human papillomavirus (HPV) and co-infections in cervical cytologic specimens from two outpatient gynecological clinics in a region of southeast Spain. *BMC Infect Dis.* 2009 10;9:124.
30. Katki H, Wentzensen N. How might HPV testing be integrated into cervical screening? *Lancet Oncol.* 2012;13(1):8-10.
31. Trottier H, Burchell A. Epidemiology of mucosal human Papillomavirus infection and associated diseases. *Public Health Genomics.* 2009;12(5-6):291-307.
32. Winer R, Kiviat N, Hughes J, Adam D, Lee S, Kuypers J, et al. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J Infect Dis.* 2005;191(5):731-8.
33. So K, Hong J, Lee J. Human papillomavirus prevalence and type distribution among 968 women in South Korea. *J Cancer Prev.* 2016;21(2):104-9.
34. Vaccarella S, Franceschi S, Snijders P, Herrero R, Meijer C, Plummer M. Concurrent infection with multiple human papillomavirus types: pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(2):503-10.
35. Shew M, Fortenberry J, Tu W, Juliar B, Batteiger B, Qadadri B, et al. Association of condom use, sexual behaviors, and sexually transmitted infections with the duration of genital human papillomavirus infection among adolescent women. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2006; 160: 151-156.
36. Samoff E, Koumans E, Markowitz L, Sternberg M, Sawyer M, Swa D, et al. Association of Chlamydia trachomatis with persistence of high-risk types of human papillomavirus in a cohort of female adolescents. *Am J Epidemiol.* 2005; 162(7): 668-675.
37. Zhu H, Shen Z, Luo H, Zhang W, Zhu X. Chlamydia Trachomatis Infection-Associated Risk of Cervical Cancer: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(13):e3077.
38. Vaccarella S, Herrero R, Snijders P, Dai M, Thomas J, Hieu N, et al. Smoking and human papillomavirus infection: pooled analysis of the International Agency for Research on cancer HPV Prevalence Surveys. *Internat J Epidemiol.* 2008; 37: 536-546.