

ARTICULO ORIGINAL

Características clínico-demográficas y tipificación del virus de papiloma humano en mujeres paraguayas con citologías negativas para lesión escamosa intraepitelial**Clinical-demographic characteristics and typification of the human papilloma virus in Paraguayan women with negative cytology for squamous intraepithelial lesion*****Mendoza LP^I, Arbiza J^{II}, Páez M^I, Kasamatsu E^I, Castro A^I, Giménez G^I, Basiletti J^{III}, Gonzalez J^{III}, Mongelós P^I, Picconi MA^{III}**^IInstituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Río de la Plata y Lagerenza, Asunción, Paraguay. Número de Fax: 480185.^{II}Sección de Virología, Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay^{III}Servicio Virus Oncogénicos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI)-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Buenos Aires, Argentina**RESUMEN**

Paraguay posee una alta tasa de incidencia de cáncer de cuello uterino de 35/100.0000 mujeres en el año 2008 y el virus de papiloma humano (HPV) es su agente causal. La planificación de medidas de prevención puede ser beneficiada con conocimientos sobre los tipos virales, por ello, el objetivo de este estudio fue determinar características clínico-demográficas y los tipos de HPV presentes en mujeres con citología negativa para lesión escamosa intraepitelial. Estudio de corte transversal con componente analítico en 207 mujeres con citología negativa para lesión escamosa intraepitelial provenientes de centros de salud de Asunción. La tipificación fue realizada por reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores MY09/11 y GP5/GP6, seguida de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción e hibridación lineal reversa, respectivamente. La asociación entre HPV y las características clínico-demográficas fue determinada por análisis de Chi cuadrado (EpiInfo versión 3,2). Se detectó alta frecuencia de HPV (21%), siendo el tipo predominante HPV 16 (4,3%) seguido de HPV 58/31 (2,4% cada uno). Se observó asociación entre la presencia de HPV y la edad ($p=0,0002$), detectándose mayor frecuencia de HPV en mujeres menores a 30 años, la cual, disminuyó al aumentar la edad, presentando un ligero aumento en mujeres de 60 años o más. En conclusión, los datos muestran una alta frecuencia de HPV y HPV 16 en mujeres menores a 30 años con citología negativa y sugieren la necesidad de realizar control posteriormente, a fin de identificar las infecciones persistentes que podrían causar lesión de cuello uterino.

Palabras clave: tipificación, virus de papiloma humano, citología negativa, características clínico-demográficas.

ABSTRACT

Paraguay has a high incidence of cervical cancer in women of 35/100,0000 in 2008 and the human papilloma virus (HPV) is the causative agent. The planning of preventive measures can be benefited by the knowledge of the viral types. Therefore, the aim of this study was to determine the clinical and demographic characteristics of the HPV types present in women with negative cytology for squamous intraepithelial lesion. This was a cross-sectional study with an analytical compound in 207 women

*Autor Correspondiente: **Dra. Laura Mendoza**, Dpto. de Salud Pública. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. UNA. Paraguay. Email: lauramendozatorres@gmail.com. saludpublica@iics.una.py. Fecha de recepción: abril de 2012, Fecha de aceptación: mayo 2012.

with negative cytology for squamous intraepithelial lesion from health centers in Asunción. The typification was performed by polymerase chain reaction using MY09/11 and GP5/GP6 primers, followed by restriction fragment length polymorphism and reverse linear hybridization. The association between HPV and clinical-demographic characteristics was determined by chi-square analysis (EpiInfo version 3.2). A high frequency of HPV (21%) was detected being the predominant type HPV 16 (4.3%) followed by HPV 58/31 (2.4% each). An association between the presence of HPV and age was observed ($p=0.0002$) and a higher frequency of HPV in women younger than 30 years was detected which decreased when age increased, showing a slight increase in women of 60 years or more. In conclusion, the data show a high frequency of HPV and HPV 16 in women under 30 years of age with negative cytology and suggest a need for further monitoring in order to identify persistent infections that could cause cervical lesion.

Keywords: classification, human papillomavirus, negative cytology, clinical-demographic characteristics.

INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano (HPV) es el principal agente causal de la neoplasia cervical intraepitelial (CIN) y del cáncer de cuello uterino. Se han detectado más de 100 tipos de HPV, de los cuales, aproximadamente 40 tipos infectan la mucosa cervical. Estos son clasificados como bajo riesgo oncogénico (LR-HPV) o alto riesgo oncogénico (HR-HPV), basados en asociaciones epidemiológicas conocidas. El grupo de HR-HPV comprende los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 que son detectados en más del 95% de los casos de carcinoma cervical (1,2).

El tipo viral infectante es considerado como el factor más importante en la patogenia del CIN y del cáncer de cuello uterino. Entre los HR-HPV, estudios realizados en varios países por la *International Agency for Research on Cancer* (IARC), demostraron que el HPV-16 es el más prevalente en la mucosa cervical, siendo detectado en el 50 a 60% de los casos de cáncer cervical, seguido del HPV-18 detectado en el 14% de los casos (3,4).

Por otro lado, han sido descriptos otros factores externos o cofactores que favorecen la adquisición de infección por HPV y el desarrollo de las lesiones precancerosas como: edad menor a 30 años, número de parejas sexuales, inicio temprano de relación sexual, multiparidad, hábito de fumar, el uso por tiempo prolongado de anticonceptivos orales, entre otros, los cuales, pueden duplicar o triplicar el riesgo de desarrollar lesiones pre-neoplásicas y cáncer en mujeres infectadas con HR-HPV (5-7).

El conocimiento de la etiología viral del cáncer de cuello uterino, ha permitido desarrollar métodos de prevención primaria y secundaria como la vacunación contra HPV y pruebas de cribado basadas en la detección de DNA HPV respectivamente (8).

El Paraguay, según datos del Globocan 2008, ocupa el séptimo lugar en incidencia de cáncer de cuello uterino en América Latina y el Caribe, con una tasa estimada de 35/100.000 mujeres, presentando una tasa de mortalidad de 16,6/100.000 mujeres, con 864 nuevos casos al año y una mortalidad anual de 407 mujeres. La planificación de aplicación de medidas de prevención primaria y secundaria puede ser ampliamente beneficiada a partir de conocimientos sobre la prevalencia de tipos específicos de HPV, edad, de mujeres sin y con lesiones de cuello uterino (9).

Considerando que en Paraguay aun existen pocos estudios de tipificación realizados en mujeres con citología negativa, el objetivo de este estudio fue determinar las características clínicas-demográficas y los tipos de HPV presentes en mujeres con citología negativa para lesión escamosa intraepitelial, con el propósito de proporcionar datos que contribuyan a fortalecer las políticas y planes nacionales de educación a la comunidad en el marco del programa de prevención de cáncer de cuello uterino (10-12).

MATERIALES Y MÉTODOS

Población

Estudio descriptivo con componente analítico, que incluyó un total de 207 muestras cérvico-vaginales de mujeres con rango de edad de 26 a 44 años que asistieron al consultorio de ginecología de centros asistenciales públicos como el Instituto Nacional del Cáncer, el Instituto de Previsión Social y el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, a fin de realizarse un control, a partir de marzo del 2007 hasta abril del 2009. Las muestras de cuello uterino de las mujeres con resultado de citología negativo para lesión escamosa intraepitelial fueron colectadas por ginecólogos y remitidas al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud para realizar gratuitamente la detección del genoma de HPV. Los criterios de inclusión fueron: mujeres que han iniciado relación sexual, no embarazadas, sin histerectomía total, sin tratamientos médicos (óvulos) o quirúrgicos (*Loop Electrosurgical Excision Procedure-LEEP*, cono u otros) y con diagnóstico citológico actual negativo para lesión escamosa intraepitelial según el Sistema de Bethesda (11).

Todas las mujeres incluidas en el estudio, completaron un cuestionario de preguntas cerradas y abiertas con datos reproductivos, demográficos y de historia clínica sexual.

Extracción del ADN de las muestras clínicas a partir de las células frescas de cuello uterino. Las células cervicales fueron recolectadas empleando un cepillo cónico *citobrush*, el cual fue colocado en un tubo con una solución conservante para mantener la integridad de la muestra. Posteriormente, la muestra fue almacenada a -70 °C en el IICS hasta su procesamiento.

Las células cervicales fueron centrifugadas y lavadas con 1 ml de PBS, manteniéndose los precipitados celulares a -70 °C hasta su procesamiento. Para la extracción del ADN genómico, el precipitado celular se resuspendió con solución tamponada de extracción, la cual contenía proteinasa K (Invitrogen, USA) y se incubó por 1 h a 56 °C; posteriormente la enzima fue inactivada a 95 °C durante 30 min y el digesto crudo se utilizó como fuente de ADN templado.

Control de calidad de los ADN templados: la integridad del ADN obtenido fue verificada mediante la amplificación por PCR de un fragmento de 268 pb del gen de la β -globina humana empleando los *primers* PC04 y GH20 (13).

Seguidamente, las muestras de cepillado cérvico-vaginales extraídas fueron procesadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar el tipo viral.

Tipificación del HPV por el método de PCR-RFLP

La detección genérica del genoma viral fue realizada en primera instancia por PCR utilizando el sistema de *primers* consenso MY 09/11 que amplifican un fragmento de 450 pb del gen viral L1 (14). Por cada procesamiento se utilizó como control positivo DNA extraído de células CaSki (portadoras de HPV16) y un control negativo (agua destilada). Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida (7%) y coloreados con nitrato de plata siguiendo las indicaciones descritas por Sanguineti et al., 2004 (15). En cada corrida electroforética fue utilizado un marcador de peso molecular F X174 DNA cortado con Hae III (Invitrogen, USA).

La determinación de los tipos de HPV se realizó por el método de RFLP, todas las muestras positivas para HPV fueron digeridas utilizando de 5 a 10 unidades de enzimas de restricción (Bam HI, Dde I, Hae III, Hinf I, Pst I, Rsa I, y Sau 3 AI, Invitrogen, USA) según la metodología descrita por Bernard et al, 1994. Los productos digeridos fueron analizados utilizando un gel de poliacrilamida 7% y coloreados con nitrato de plata. En cada corrida electroforética fue utilizado un marcador de peso molecular F X174 DNA cortado con Hae III (Invitrogen, USA). Finalmente los patrones de bandas obtenidos fueron comparados con un mapa de restricción de referencia (16).

La clasificación de los tipos de HR-HPV se realizó según la *WHO International Agency for Research on Cancer* (IARC): 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 59, 56, 58 y 66 (*International Agency for Research on Cancer*, 2007)(17).

Tipificación por el método de PCR (GP5, bio6+) seguido de hibridación lineal reversa (RLB)

Cuando la detección por PCR MY9,11 resultó negativa o mostró productos inespecíficos que impedían su posterior tipificación por RFLP, las muestras fueron reamplificadas usando cebadores genéricos GP 5,6+ que producen un fragmento de 140 pb dentro del mismo gen viral. El método de GP5, 6 fue realizado como describe Jacobs et al., 1995, con la excepción que el *primer* GP5, 6+ fue biotinilado (BioGP6+)(18).

La tipificación fue realizada por hibridación lineal reversa (RLB) que permite la detección de 37 tipos de HPV. El análisis RLB se realizó según van den Brule et al., 2002 (19). Para la recuperación de la membrana por disociación del producto de PCR, la misma se lavó 2 veces con 100 ml de 1% SDS a 80°C por 30 min, cada vez seguida por una incubación en 150 ml de 20 mM EDTA (pH 8) a temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente, se guardó la membrana húmeda en un plástico transparente y cerrado herméticamente a 4° C hasta el nuevo uso. Según recomendaciones de van den Brule et al., 2002 y la experiencia previa del Laboratorio de Virus Oncogénicos (Instituto Malbran), la membrana fue utilizada hasta 15 veces (19).

Análisis estadísticos

El análisis de los datos fue realizado empleando estadística descriptiva y analítica. Se calculó el intervalo de confianza 95% (IC_{95%}) para todas las proporciones. Para identificar la asociación entre la infección por HPV y características clínico demográficas se realizó el análisis de Chi cuadrado por el programa de EpiInfo versión 3,2. Para todos los análisis de datos realizados, los valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Asuntos éticos

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción. Todas las mujeres participantes firmaron un consentimiento informado individual, previa explicación del estudio. Todos los datos e informes de resultados fueron procesados respetando la confidencialidad de las participantes.

RESULTADOS

Se observó infección por HPV en 21%IC_{95%}16-27 (43/207) de mujeres con citologías negativas. Entre las 43 mujeres positivas para HPV se evidenció un total de 4 infecciones múltiples (9,3%IC_{95%}2,6-22). Todas las muestras incluidas en el estudio fueron positivas para B-globina y fueron consideradas apropiadas. Se observó además, asociación entre infección por HPV y edad menor a 30 años, $p=0,0002$ (tabla 1).

Tabla 1. Características clínico-demográficas de 207 mujeres con citología negativa según resultados de detección de infección por virus de papiloma humano, periodo 2007/2009

Variable ^a	Positiva para HPV nº (% IC ₉₅)	Negativa para HPV nº (% IC ₉₅)	Chi cuadrado, (p)
Total	43 (100)	164 (100)	
Edad			
<30 años	27 (63 IC ₉₅ %47-77)	53 (32 IC ₉₅ %25-40)	p=0,0002
>30 años	16 (37 IC ₉₅ %23-53)	111 (68 IC ₉₅ %60-75)	
Procedencia			
Alrededores de Asunción	31 (72 IC ₉₅ %56-85)	125 (76 IC ₉₅ %69-82)	p=0,58
Asunción	12 (28 IC ₉₅ %15-44)	39 (24 IC ₉₅ %18-31)	
Educación			
Primaria	4 (9 IC ₉₅ %2,6-22)	36 (22 IC ₉₅ %16-29)	p=0,06
Secundaria o más	39 (91 IC ₉₅ %78-97)	128 (78 IC ₉₅ %71-84)	
Inicio de relaciones sexuales (años)			
≤15	3 (7 IC ₉₅ %1,5-19)	13 (8 IC ₉₅ %4,3-13)	p=0,84
>15	40 (93 IC ₉₅ %81-98)	151 (92 IC ₉₅ %87-96)	
Número de parejas sexuales, (%)			
≥ 4	3 (7 IC ₉₅ %1,5-19)	12 (7 IC ₉₅ %4-12)	p=0,94
<4	40 (93 IC ₉₅ %81-93)	152 (93 IC ₉₅ %88-96)	
Antecedentes de embarazo			
Si	27 (63 IC ₉₅ %47-77)	122 (74 IC ₉₅ %67-81)	p=0,13
No	16 (37 IC ₉₅ %23-53)	42 (26 IC ₉₅ %19-33)	
Número de embarazos			
≥6	2 (5 IC ₉₅ %0,6-16)	11 (7 IC ₉₅ %3,4-12)	p=0,62
<6	41 (95 IC ₉₅ %84-99)	153 (93 IC ₉₅ %88-97)	
Edad del primer embarazo			
≤19 años	9 (21 IC ₉₅ %10-36)	33 (20 IC ₉₅ %14-27)	p=0,91
> 19 años	34 (79 IC ₉₅ %64-90)	131 (80 IC ₉₅ %73-86)	
Uso de anticonceptivos orales			
Si	11 (26 IC ₉₅ %14-41)	48 (29 IC ₉₅ %22-37)	p=0,63
No	32 (74 IC ₉₅ %59-87)	116 (71 IC ₉₅ %63-78)	
Hábito de Fumar			
Si	2 (5 IC ₉₅ %0,6-16)	18 (11 IC ₉₅ %7-17)	p=0,21
No	41 (95 IC ₉₅ %84-99)	146 (89 IC ₉₅ %83-93)	

HPV: virus de papiloma humano. IC: intervalo de confianza.

En relación a la tipificación de HPV, se observó 5 tipos de HR-HPV y 15 tipos de LR-HPV. HPV 16 fue el más predominante con una frecuencia del 4,3% IC₉₅%2-8, seguido de HPV 58 (2,4% IC₉₅%0,8-6) y HPV 31 (2,4% IC₉₅%0,8-6) (tabla 2).

Tabla 2. Prevalencia de tipos de virus de papiloma humano en 207 mujeres paraguayas con citología negativa, provenientes de 3 centros de salud, periodo 2007/2009

LR-HPV	nº	HR-HPV	nº	LR y HR-HPV	nº	LR-HPV	nº (% IC _{95%}) ^a	HR-HPV	nº(% IC _{95%}) ^a
11	2	16	8	52+51	1	81	4 (1,9 IC _{95%} 0,5-5)	16	9 (4,3 IC _{95%} 2-8)
61	2	31	5	+6+40	1	42	2 (1,0 IC _{95%} 0,1-3)	31	5 (2,4 IC _{95%} 0,8-6)
72	2	58	4	+43		11	2 (1,0 IC _{95%} 0,1-3)	58	6
81	2	45	2	16+58		72	2 (1,0 IC _{95%} 0,1-3)	45	5 (2,4 IC _{95%} 0,8-6)
26	1	59	2	+81		61	2 (1,0 IC _{95%} 0,1-3)	52	6
42	1	52	1			26	1 (0,5 IC _{95%} 0-3)	59	3 (1,4 IC _{95%} 0,3-4)
62	1	33+45	1			6	1 (0,5 IC _{95%} 0-3)	51	4
67	1					40	1 (0,5 IC _{95%} 0-3)	33	2 (1 IC _{95%} 0,1-3)
70	1					43	1 (0,5 IC _{95%} 0-3)		2 (1 IC _{95%} 0,1-3)
71	1					62	1 (0,5 IC _{95%} 0-3)		1 (0,5 IC _{95%} 0-3)
82	1					67	1 (0,5 IC _{95%} 0-3)		1 (0,5 IC _{95%} 0-3)
89	1					70	1 (0,5 IC _{95%} 0-3)		
42	1					71	1 (0,5 IC _{95%} 0-3)		
+						82	1 (0,5 IC _{95%} 0-3)		
81						89	1 (0,5 IC _{95%} 0-3)		

HPV: virus de papiloma humano. HR-HPV: HPV de alto riesgo oncogénico. LR-HPV: HPV de bajo riesgo oncogénico. IS: infección simple. IM: infección múltiple. ^aPrevalencia de HPV incluyendo infecciones múltiples e infecciones simples. IC:intervalo de confianza.

Del total de 207 mujeres con diagnóstico negativo para lesión escamosa intraepitelial, se observó una mayor frecuencia de HPV y HR-HPV en menores a 30 años de 34% IC_{95%}24-45 y 21% IC_{95%}13-32, respectivamente. En adición, tanto en la frecuencia de HPV como HR-HPV al aumentar la edad, se evidenció una disminución a la mitad o al tercio del valor observado en las mujeres con menos de 30 años. Finalmente, de las 8 mujeres mayores a 60 años, 1 fue positiva para HR-HPV (12% IC_{95%}0,3-53), observándose un ligero aumento de frecuencia de HPV en este grupo etareo, a pesar del bajo número de mujeres estudiadas. Cabe destacar, que todos los casos de infecciones múltiples fueron detectados en mujeres menores a 30 años (tabla 3).

Tabla 3. Distribución de tipos de virus de papiloma humano por grupo etáreo de las 207 mujeres paraguayas con citología negativa provenientes de 3 centros de salud, periodo, 2007/2009.

Variable	EDAD (años)				
	< 30 nº (%;IC _{95%})	30 a 39 nº (%;IC _{95%})	40 a 49 nº (%;IC _{95%})	50 a 59 nº (%;IC _{95%})	> 60 nº (%;IC _{95%})
nº de muestras	80	49	51	19	8
nº de HPV positivos	27 (34; IC _{95%} 24-45)	8 (16; IC _{95%} 7-30)	6 (12; IC _{95%} 4,4-24)	1 (5; IC _{95%} 0,1-26)	1 (12; IC _{95%} 0,3-53)
nº de HR-HPV	17 (21; IC _{95%} 13-32)	3 (6; IC _{95%} 1,3-17)	4 (8; IC _{95%} 2,2-19)	-	1 (12; IC _{95%} 0,3-53)
nº de IM	4 (5; IC _{95%} 1,4-12)				

HPV: virus de papiloma humano. HR-HPV: HPV de alto riesgo oncogénico. IM: infección múltiple. IC: intervalo de confianza.

DISCUSIÓN

El Paraguay es un país con alta incidencia de cáncer de cuello uterino. Este trabajo provee información sobre la distribución de tipos y características clínico-demográficas presentes en mujeres con citología negativa.

Se observó una alta frecuencia de infección por HPV en mujeres con citología negativa (21%). Esta frecuencia es mayor a la observada en Europa (8%), Asia (8%) y comparable a la observada en estudios previos del Paraguay (19,8%), así como, a la

de África (22%) y países como el Brasil (23%), zonas en las cuales se observa una alta incidencia de cáncer de cuello uterino (Rolón et al., 2000; Franco et al 1999; Burchell et al., 2006) (10,20,21). En adición, en un meta-análisis realizado por de Sanjose et al., 2007, incluyendo 14.586 mujeres con citología normal, provenientes de Costa Rica, Honduras, México, Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Paraguay y Perú, la prevalencia de HPV fue de 12,3% en América Sur y de 20,4% en América Central (22). Cabe destacar, que la disparidad en la prevalencia de HPV observada en los trabajos anteriores puede deberse a diversos factores como: parámetros geográficos y étnicos, comportamiento sexual, entre otras, así como la sensibilidad y técnicas de utilizadas para la detección de HPV (23).

Se observó una asociación entre la edad menor a 30 años y la infección por HPV ($p=0,0002$), en concordancia con estudios anteriores de Sanjosé et al., 2007; Lewis MJ, 2004; Almonte et al., 2008; Castellsague X, 2008; que observaron que la infección por HPV ocurre en mayor frecuencia en mujeres menores de 30 años, sugiriendo que es debido a que las mujeres jóvenes que se encuentran en el periodo de mayor actividad sexual, exponiéndose así a adquirir infección por HPV (22,24-26). La edad es un factor a tener en cuenta siempre en la dinámica de toda patología, fundamentalmente porque en muchos casos nos ayuda a identificar los grupos más expuestos y focalizar la atención y recursos de manera más efectiva.

En 207 mujeres con citología negativa se observó una mayor frecuencia de HPV 16 de 4,3%, siendo mayor a la estimada mundialmente de 2,6, y en América Central y del Sur de 3,1 (4,22). Otros tipos virales observados en orden de prevalencia en mujeres con citología negativas fueron HPV 31/58 (2,4% cada uno), HPV 81 (1,9%); HPV 45 (1,4%), entre otros menos frecuentes. La alta prevalencia de HR-HPV observada es alarmante ya que trabajos estiman que entre el 15-30% de mujeres con citología normal infectadas con estos tipos virales desarrollarán H-SIL en los próximos 4 años (2,27). Dada la mayor tendencia del HPV 16 a persistir e inducir lesiones con más alto riesgo de progresión maligna en relación a otros HR -HPVs, la alta prevalencia de HPV 16 observada en las mujeres con NSIL de este estudio, podría explicar en parte la elevada incidencia de cáncer de cuello uterino en el Paraguay (28).

En un meta-análisis realizado por Bosch et al., 2008, en mujeres con citología negativa, fue observado que luego del HPV 16 los tipos más prevalentes mundialmente fueron; HPV 18/58/52 (0,9%), HPV 51/31 (0,6%), HPV 56/33 (0,5%), con variaciones según la región, siendo el segundo tipo de HPV más prevalente detectado en el Norte de África y Noreste y Oeste de Europa el HPV 18, en el Oeste de África y América del Sur el HPV 58, en Centro América y el Este de Europa el HPV 31, en el Sur de Europa el HPV 66 y finalmente en América del Norte el HPV 53 (4,22). Estos resultados demuestran que la distribución de tipos de HPV en mujeres con citología negativa puede variar mucho de acuerdo a la región; sin embargo, el presente estudio concuerda con los meta-análisis que observaron que el HPV 58 y HPV 31 tanto mundialmente como en América Central y del Sur ocupan entre el segundo y tercer lugar en prevalencia, respectivamente.

El modo en que se distribuye la frecuencia de infección de HPV según la edad difiere en mayor o menor medida de un país o región a otro. En este estudio la frecuencia de HPV en mujeres con citología negativas fue disminuyendo al aumentar la edad, presentando un ligero aumento en mujeres de 60 años o más, a pesar del bajo número de mujeres estudiadas en este último rango etáreo. Las curvas en U, como en este trabajo, se han observado en ciertas poblaciones con alto riesgo de cáncer cervical (22,25,27-29).

Se han ensayado distintas hipótesis para tratar de explicar este tipo de curva. La disminución de frecuencia alrededor de los 30 años de edad puede deberse a que el 80 a 90% de estas mujeres por debajo de los 30 años ya han iniciado sus relaciones sexuales y han sido expuestas a infección por HPV, desarrollando una inmunidad

natural, la cual permite eliminar la infección en un periodo de aproximadamente 24 meses. Es interesante mencionar, que el 10 a 20% de mujeres que poseen una infección persistente tienen mayor riesgo de desarrollar una lesión si no son diagnosticadas y tratadas correctamente (28). El segundo pico tiende a aparecer, en la mayoría de los casos, en edades posteriores a la menopausia, por lo que un argumento es que el cambio hormonal producido en esta etapa de la vida podría favorecer la reactivación de infecciones latentes. Otros autores justifican este segundo pico en un cambio en la conducta sexual en una etapa media de la vida, con nuevas experiencias sexuales y un aumento de nuevas parejas (22,26,29). Este último argumento estaría a favor de pensar que aún las mujeres mayores estarían en riesgo de adquirir nuevas infecciones y por lo tanto serían beneficiadas por la vacunación contra HPV.

En adición, en este trabajo se encontró que los 4 casos de infecciones múltiples fueron detectados a una edad menor a 30 años. Esto concuerda con las numerosas publicaciones que han establecido un pico de frecuencia de la infección por HPV en las mujeres muy jóvenes (menores de 30 años), con alta circulación de HR-HPV; presentando de 20 al 40% de ellas infecciones con al menos dos tipos de HPV adquiridos simultáneamente o sucesivamente (30-32).

En suma, se observó una alta frecuencia de infección por HPV en mujeres con citología negativa (21%), siendo el tipo viral más frecuente el HPV 16 seguidos de otros HR-HPV, lo cual podría explicar en parte la elevada incidencia de cáncer de cuello uterino en nuestro país. En adición, se observó una asociación entre infección por HPV y una edad menor a 30 años, indicando la susceptibilidad de este grupo etáreo de adquirir la infección y la necesidad de realizar un control para identificar las infecciones persistentes de HPV que podrían causar lesión de cuello uterino. En relación a la distribución de HPV según la edad se observó una curva en U, presentando dos picos uno por debajo de los 30 años y el segundo pico en 60 años o más, lo cual, a pesar del tamaño de muestra limitado está en concordancia a lo observado en ciertas poblaciones con alto riesgo de cáncer cervical.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002; 55(4):244-65.
2. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348(6):518-27.
3. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010; 11(11):1048-56.
4. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine.* 2008;26 (Suppl 10): K1-16.
5. Smith JS, Green J, Berrington de Gonzalez A, Appleby P, Peto J, Plummer M, et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet;* 361(9364):1159-67.
6. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13 541 women with carcinoma of the cervix and 23 017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer.* 2006; 118(6):1481-95.
7. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16 563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer.* 2006; 119: 1108-24.
8. Sherpa AT, Clifford GM, Vaccarella S, Shrestha S, Nygård M, Karki BS, et al. Human papillomavirus infection in women with and without cervical cancer in Nepal. *Cancer Causes Control.* 2010; 21(3):323-30.

9. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010; 127(12):2893-917.
10. Rolón PA, Smith JS, Muñoz N, Klug SJ, Herrero R, Bosch X, et al. Human papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay. *Int J Cancer* 2000; 85:486-91.
11. Mendoza Torres L, Páez M, Insaurrealde A, Rodríguez MI, Castro A, Kasamatsu E. Detection of high risk human papillomavirus cervical infections by the hybrid capture in Asunción, Paraguay. *Braz J Infect Dis*. 2009 ; 13(3): 203-6.
12. Mendoza LP, Arbiza J, Paez M, Kasamatsu E, Castro A, Giménez G, et al. Distribution of human papillomavirus genotypes in Paraguayan women according to the severity of the cervical lesion. *J Med Virol*. 2011; 83(8): 1351-7.
13. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-91.
14. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Cancer Cell* 1989; 7:209-14.
15. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*. 1994;17(5):914-21.
16. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis*. 1994;170:1077-85.
17. ARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. International Agency for Research on Cancer. Human Papillomaviruses. Lyon, France : WHO; 2007. ARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 90.
18. Jacobs MV, de Roda Husman AM, Van den Brule AJ, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM. Group-specific differentiations between high, and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotides probes. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 901-5.
19. Van Den Brule AJ, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJ, Snijders PJ. GP5p/6p PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol* 2002; 40:779-87.
20. Franco EL, Villa LL, Sobrinho J, Prado JM, Rousseau MC, Désy M, et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J. Infect Dis*. 1999;180(5): 1415-23.
21. Burchell AN, Winer RL, de Sanjose S, Franco EL. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine* 2006; 24(Suppl.3):S52-61.
22. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007; 7(7):453-9.
23. Ripabelli G, Grasso GM, Del Riccio I, Tamburro M, Sammarco ML. Prevalence and genotype identification of human papillomavirus in women undergoing voluntary cervical cancer screening in Molise, Central Italy. *Cancer Epidemiol*. 2010; 34(2): 162-7.
24. Lewis, MJ. A situational analysis of cervical cancer in Latin America and the Caribbean. Washington, D.C : PAHO; 2004.
25. Almonte M, Albero G, Molano M, Carcamo C, García PJ, Pérez G. Risk factors for human papillomavirus exposure and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean. *Vaccine*. 2008; 26(Suppl 11): L16-36.
26. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2008; 110(3 Suppl 2):S4-7.
27. Muñoz N, Méndez F, Posso H, Molano M, Van Den Brule AJ, Ronderos M, et al. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis*. 2004;190(12):2077-87.
28. Bogaards JA, Xiridou M, Coupé VM, Meijer CJ, Wallinga J, Berkhof J. Model-based estimation of viral transmissibility and infection-induced resistance from the age-dependent prevalence of infection for 14 high-risk types of human papillomavirus. *Am J Epidemiol*. 2010; 171(7):817-25.
29. Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, Snijders PJ, Arslan A, Anh PT, et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer*. 2006; 119(11):2677-84.

30. Nielsen A, Kjaer SK, Munk C, Iftner T. Type specific HPV infection and multiple HPV types: prevalence and risk factor profile in nearly 12,000 younger and older Danish women. *Sex Transm Dis.* 2008; 35:276-82.
31. Smith JS, Melendy A, Rana RK, Pimenta JM. Age-specific prevalence of infection with human papillomavirus in females: a global review. *J Adolesc Health.* 2008; 43(4 Suppl):S5-25.
32. Louie KS, de Sanjose S, Diaz M, Castellsagué X, Herrero R, Meijer CJ, et al. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Early age at first sexual intercourse and early pregnancy are risk factors for cervical cancer in developing countries. *Br J Cancer.* 2009; 100(7):1191-7.