

Artículo

DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA, EN MUESTRAS CERVICALES DE ESTUDIANTES. UNIVERSIDAD DE CARABOBO. VENEZUELA.

DETECTION AND TYPING OF THE HUMAN PAPILOMA VIRUS BY POLIMERASA CHAIN REACTION IN CERVICAL SAMPLES OF STUDENTS. CARABOBO UNIVERSITY. VENEZUELA.

Luz Maria Sanoja¹

RESUMEN

Con el objetivo de determinar la frecuencia y genotipos del virus del papiloma humano (VPH) en estudiantes de la Universidad de Carabobo Núcleo Aragua, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con posterior análisis por restricción enzimática (RFLP). Se realizó toma de muestra para citología convencional y diagnóstico molecular a 43 estudiantes, entre 17 y 41 años de edad. La positividad viral hallada fue de 34,9%. Se detectaron cinco tipos de VPH, que en orden decreciente de frecuencia fueron 6 (46,7%); 11 (26,7%); 53 (13,3%) y 31 y 35 (6,7% cada uno). En ningún caso se encontró VPH tipo 16, 18, ni casos de infecciones múltiples. Predominaron los genotipos de bajo riesgo con 73,4%. El grupo de edad que presentó el porcentaje mayor de casos positivos fue de 20 a 24 años (53,3%). Todos los casos (100%) con VPH de alto riesgo se presentaron en pacientes entre 18 y 24 años. La citología reportó 20,9 % de casos con VPH, mientras que la técnica de PCR-RFLP detectó 34,9% de casos con VPH. En conclusión estos resultados, con carácter preliminar, proporcionan datos útiles sobre el estado de la infección por VPH en el grupo de estudiantes universitarias evaluadas.

PALABRAS CLAVE: Virus de Papiloma Humano, Citología cervical, Diagnóstico molecular.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the frequency and genotypes of human papillomavirus (HPV) in students at the University of Carabobo. Aragua Nucleus, using the technique of chain reaction (PCR) with subsequent restriction enzyme analysis (RFLP). Was conducted sampling for conventional cytology and molecular diagnosis to 43 students between 17 and 41 years old. The Viral positivity was 34.9%. Were detected five types of HPV. In decreasing order of frequency were 6 (46.7%); 11 (26.7%); 53 (13.3%) y 31 and 35 (6.7% each). In no case was found HPV type 16, 18, or cases of multiple infections. Predominance of low-risk genotypes with 73.4%. The age group that presented the highest percentage of positive cases was 20 to 24 years (53.3%). 100% of HPV cases of AR occurred in patients aged 18 to 24 years. The cytology reported 20.9% of cases with HPV, while PCR-RFLP detected 34.9% of cases with HPV. In conclusion these results preliminary, provides useful data on the status of HPV infection in the group of university students evaluated.

KEY WORDS: Human papilloma virus, Cervical cytology, Molecular diagnostics.

¹Medico Anatomopatólogo - Docente Departamento Clínico Integral. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Ciencias de la Salud, Sede Aragua. Universidad de Carabobo. Correspondencia: luzsanojauc@gmail.com.

INTRODUCCIÓN

El Virus Papiloma Humano (VPH) es un agente infeccioso perteneciente a la familia Papillomaviridae, altamente específico de especies y tejidos, con tropismo exclusivo por las células epiteliales de las mucosas y de la piel, se caracteriza por la capacidad de inducir el desarrollo de un amplio espectro de lesiones de distinto grado de severidad.¹⁻⁴

Los estudios epidemiológicos han confirmado la asociación etiológica entre el VPH y el cáncer de cérvix.^{1,3,4} Un estudio multicéntrico sobre la prevalencia del VPH, llevado a cabo por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) en 22 países, proporcionó la evidencia epidemiológica más sólida sobre la relación entre el VPH y el cáncer cervical, al demostrar que 99,7% de los casos de cáncer cervical, confirmados histológicamente, presentaron ADN VPH.^{1,3-6}

Diversas investigaciones también han permitido determinar que aún cuando la presencia del VPH es una condición necesaria, no es suficiente para promover el desarrollo de lesiones escamosas a intraepiteliales y cáncer de cuello uterino.^{1,2,7-10} Otros cofactores como genotipo y carga viral, tabaquismo, paridad, hormonas, inmunodepresión, otras coinfecciones, nutrición y dieta modulan el riesgo de progresión, pero no actúan con independencia del VPH.^{2,3,7-10} Igualmente las investigaciones han permitido dilucidar los pasos de la carcinogénesis cervical, que han sido reproducidos, distinguidos, estudiados y usados en los programas de prevención. Estos pasos incluyen infección por VPH, progresión de la infección a lesiones intraepiteliales y cáncer invasivo.^{2,3,8}

A nivel mundial, el cáncer del cuello uterino es el segundo más frecuente en mujeres después del cáncer de mama; 80% de estos casos se presenta en países en vías de desarrollo y afecta en forma creciente a féminas cada vez más jóvenes.^{1,10-12} En el año 2009 la Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que, en Suramérica, cada año 48.328 mujeres son diagnosticadas con cáncer cervical y 21.402 mueren de esta enfermedad.¹¹ En Venezuela esta patología constituye un importante problema de salud pública por la alta morbilidad; para el año 2009 se reportaron, por esta causa, 1.199 muertes en el país y 81 en el Estado Aragua.¹³ Esta patología es un marcador de países subdesarrollados; y en América Latina y el Caribe los programas de prevención secundaria para cáncer de cuello uterino no han tenido los resultados esperados, reducción importante en la morbilidad y mortalidad,

como se ha observado en países industrializados de Europa y Norteamérica. Las razones se relacionan, en parte, con el poco conocimiento del cáncer cervical como una enfermedad prevenible, un manejo y coordinación sub-óptima de los programas de prevención y control del cáncer cervical, calidad de servicios inadecuados y la condición socio-cultural de las mujeres.^{1,12}

Como consecuencia de su transmisión sexual, la infección por VPH constituye una de las infecciones de transmisión sexual más comunes en la población. La infección por VPH se presenta en 70% de las mujeres sexualmente activas a lo largo de su vida.^{1-3,9,10} La prevalencia y sus diferentes tipos, varía ampliamente en el mundo, además, los estudios indican que la edad puede ser un factor de riesgo para su adquisición, siendo más común la infección en las mujeres jóvenes sexualmente activas, con un pico de mayor incidencia entre los 20 y 25 años.^{1,2,7,9,14} En este grupo, la prevalencia de infección subclínica por VPH puede afectar hasta 40% de la población femenina. Por encima de 35 años, la prevalencia de infección declina gradualmente. A pesar de la alta prevalencia, la mayor parte de estas infecciones tienen un carácter transitorio, persistiendo durante 8 a 12 meses y no relacionándose con ningún riesgo de transformación neoplásica.^{1,2,5,7,9,14-16} Este riesgo se limita al grupo de mujeres en las que la infección es persistente (10-20%).^{1,2,3,7,16}

Hasta la fecha, se han identificado más de 100 tipos de VPH. De ellos, alrededor de 40 tipos han sido identificados en la región anogenital. De acuerdo con el riesgo oncogénico se clasifican en: bajo riesgo (BR) los VPH 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108; alto riesgo (AR) los VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82; y los tipos 24, 56 y 66 deben considerarse como probables carcinógenos o probables alto riesgo (PAR).^{2,4}

La infección por VPH de bajo riesgo, sobre todo por los VPH 6 y 11, produce lesiones anogenitales benignas o infecciones subclínicas que suelen ser transitorias y los VPH de alto riesgo se asocian con la neoplasia intraepitelial cervical (NIC), carcinoma *in situ* y el carcinoma invasor.^{1,3,4,16,17} Los tipos 16,18,45,31,33,52,58 y 35 se asocian con 95% de todos los casos de cáncer cervicouterino en el mundo, lo cual implica que una vacuna contra los cinco tipos más comunes de VPH en el mundo podría prevenir alrededor de 90% de los casos de esta enfermedad, aunque las diferencias en la distribución de los tipos de VPH en algunas zonas geográficas podría cambiar estas estimaciones.^{1,2,4}

Estas variaciones en la distribución geográfica del VPH fueron demostradas a través de un estudio mundial en carcinomas de cuello uterino realizado por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC).^{1,4,18} Es por ello que la Organización Mundial de la Salud propicia estudios de prevalencia de VPH en distintas regiones del mundo,¹¹ ya que la ausencia de registros de la infección por VPH en áreas extensas del mundo, notablemente en los países en desarrollo con altas tasas de cáncer cervical, limita la interpretación de la carga del VPH y su asociación con lesiones cervicales en estas regiones,^{4,11} así como el desarrollo de vacunas adaptadas a las diferentes regiones geográficas.^{1,4-18}

Venezuela se encuentra dentro de los países que no presenta registros oficiales de la prevalencia del VPH, ni de los genotipos más frecuente en el país. De hecho, el WHO/ICO Information Center on HPV and Cervical Cancer coordinado por la Organización Mundial de la Salud no dispone de datos sobre la frecuencia y genotipos de VPH en el país.¹⁹ Sin embargo, existen trabajos de varios grupos de investigación que han estudiado el comportamiento biológico de este virus en pequeñas poblaciones en diferentes zonas del país, los cuales reportan valores de positividad para el VPH muy variables (27% a 85%).²⁰⁻²⁹

El método primario para la detección de VPH sigue siendo la citología convencional, la cual ha ayudado a reducir la incidencia del cáncer cervical en las naciones desarrolladas. La citología permite detectar el efecto citopático del virus en las células epiteliales, pero presenta la desventaja de no poder identificar la infección por VPH en su fase latente, así como tampoco determinar el genotipo viral; sólo el uso de técnicas moleculares detecta la presencia de ADN viral y permite tipificarlo.^{1,3,5,11}

Las técnicas moleculares para la identificación del ADN del VPH son altamente sensibles y específicas. Entre ellas, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con iniciadores genéricos, seguida de análisis de los fragmentos de restricción de longitud variable o polimórficas (RFLP), ha demostrado una mejor sensibilidad (entre 83,9% y 100%) que la citología para la detección del VPH, pero con una especificidad menor (64,1% a 95,1%)^{1,2,3,6}. La utilización, en conjunto, de ambos métodos es muy efectivo para identificar las mujeres con más riesgo de desarrollar cáncer cervical.^{1,3,5,8-10}

Considerando la asociación de algunos tipos de VPH con lesiones neoplásicas del cuello uterino y la variabilidad geográfica de los tipos de VPH se

comprende que la búsqueda y tipificación del VPH no responde a un mero interés académico, sino que resulta de gran importancia. El conocimiento de la frecuencia y distribución de los tipos de VPH en cada región geográfica, y en especial en la población joven, en la cual esta infección tiene una alta frecuencia, podría contribuir al control de la enfermedad y al desarrollo de programas de prevención primaria y secundaria del cáncer de cuello uterino adaptados a las características de cada región.^{1,4,8,9,18,30} Por tal motivo, se desarrolló el presente estudio, cuyo principal objetivo fue determinar la frecuencia y genotipos de VPH por técnicas moleculares en muestras cervicales de estudiantes de la Universidad de Carabobo, Núcleo Aragua y comparar con los hallazgos citológicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo, y de corte transversal donde se evaluaron muestras cervicales de 43 estudiantes de la Universidad de Carabobo, Núcleo Aragua, que asistieron a las "Jornadas de Salud Ginecológica Responsable" realizadas en la Coordinación General de Salud del Núcleo Aragua y en los Servicios Médicos de la Asociación de Profesores de la Universidad de Carabobo, Aragua, entre los meses de mayo y agosto de 2009.

Previa promoción y difusión informativa mediante afiches y trípticos se inició la atención de todas las estudiantes que asistieron y aceptaron participar voluntariamente en el estudio, manifestándolo mediante la firma de un consentimiento informado.

Se utilizó como criterio de inclusión tener vida sexual activa, mientras que los criterios de exclusión fueron: (i) estudiantes histerectomizadas, (ii) con sangrado vaginal, (iii) embarazadas y (iv) en puerperio inmediato.

TOMA DE MUESTRAS

A cada paciente se le realizó examen físico con exploración ginecológica, se tomó una primera muestra para PCR-RFLP mediante un raspado firme del endocervix y exocervix, sin producir sangrado, con hisopo de algodón estéril, éste se colocó en un vial estéril y preservó a 4°C hasta su procesamiento. Una segunda muestra fue obtenida de exocervix con espátula de madera y de endocervix con citobrush para estudio citológico convencional. Los extendidos se fijaron con fijador celular (citofix®).

ESTUDIO CITOLÓGICO

Los frotis citológicos de exocervix y endocervix fueron coloreados con tinción de Papanicolaou modificada por Martínez (Pap-Mart®)³¹ e interpretados por un médico anatomopatólogo según los criterios pautados por el sistema Bethesda 2001.³²

Detección y tipificación del VPH por PCR-RFLP

Las pruebas de biología molecular se realizaron en la Unidad de Biología Molecular del Laboratorio Genomik C.A., Maracay, Estado Aragua.

A las 43 muestras tomadas se les investigó la presencia de ADN vírico del VPH utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) combinada con análisis por enzimas de restricción (RFLP) para la tipificación, tomada de los protocolos propuestos por Adams *et al.*^{21,24,33}

Extracción y Amplificación del ADN de VPH

Para la extracción y la amplificación del ADN vírico, se usó el kit PVHfast de Pharmagen®, procediendo según las instrucciones recomendadas por el fabricante del kit.

Para evitar contaminación en la amplificación, la PCR se efectuó en tres etapas: 1) preparación de la muestra, 2) ensamblaje de la reacción y 3) visualización del producto.

La amplificación se realizó con cebadores de consenso o genéricos (MY09 y MY11), que permiten amplificar un fragmento de aproximadamente 450 pares de bases (pb) correspondientes a la región L1 del genoma viral. Esta región, a pesar de que es muy similar entre los distintos tipos de VPH, presenta pequeñas variaciones en la secuencia de bases entre unos tipos y otros, lo que hace posible detectar un amplio espectro de tipos de VPH que, habitualmente, infectan el tracto anogenital, con este único par de cebadores y en una sola reacción.³³

El procedimiento fue el siguiente: por cada muestra, a un tubo de reacción con 45 µl de la solución β-globina se añadió 5 µl de ADN extraído, colocándose en un termociclador modelo PTC-100 (M.J-Research, Inc) (para los cebadores S7/ S8), con los siguientes ciclos: 4 minutos a 94 °C donde se llevó a cabo el primer ciclo de desnaturalización, 30 segundos a 94°C para completar el ciclo de desnaturalización, 1 minuto a 55 °C para el ciclo de hibridación de los cebadores en el

ADN, 90 segundos a 72°C para la amplificación, y 10 minutos a 72°C para la amplificación final. En un gel de agarosa al 2% preparado en solución 0,045 M tris-borato, 0,001 M EDTA pH 8,0 (TBE 1X) más 0,5 µg/ml de bromuro de etidio, se colocó una mezcla con 7 018µl del producto amplificado y 2 µl de solución de carga, incluyendo 0,5 µg de marcador de peso molecular 100 pares de bases (pb) DNA Ladder (Promega®), para correrlos en electroforesis por 1 hora. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta. Se consideraron positivos los que tuvieron una talla amplificada de 450 pb correspondiente al genoma del VPH. En todas las reacciones de amplificación, se incluyó como control positivo el ADN purificado de células HeLa, infectadas con VPH tipo 18 y células SiHa, infectadas con VPH tipo 16 y, como control negativo, ADN de células humana que no contiene el genoma de VPH.

Tipificación del VPH

Para tipificar las muestras positivas se incubaron con las enzimas de restricción incluidas en el Kit PVHFast, que actúan sobre las zonas variables de la región amplificada y permiten diferenciar más de 50 tipos de papilomavirus que afectan a las mucosas, ya que cada tipo de VPH tiene un patrón de banda característico. Se tomaron 27 µl de cada muestra amplificada positiva para VPH y se les añadió 2,5 µl de la enzima 1 de restricción resuspendiendo varias veces; posteriormente se tomaron 15 µl de esta mezcla y se agregó 1µl de la enzima 2 de restricción; se incubaron los tubos de enzima 1 y enzima 1 + enzima 2 por 2 horas; luego se añadió a cada tubo 3 µl de solución de carga, colocándose esta mezcla en un gel de agarosa de alta resolución al 2,5 % en tapón TBE 1X más bromuro de etidio a 0,5 g/ml. Se incluyó 0,5µg del marcador de peso molecular 100 pb ADN Ladder (Promega®) para correr la electroforesis y se corrió a 80 voltios por 1 hora y se visualizaron las bandas de ADN en un transiluminador de luz ultravioleta. La banda amplificada de ADN de VPH de 450 pb se digiere originando un patrón de banda en función del genotipo viral. Los patrones de restricción fueron analizados según lo descrito por Davidson *et al.*³⁴

Los resultados de la citología y el PCR fueron entregados a todas las pacientes y aquellas con resultados positivos fueron referidas a un Centro Asistencial para su tratamiento y seguimiento.

Análisis Estadístico

Para el análisis descriptivo se construyeron tablas de frecuencia y de contingencia para mostrar la

distribución de las variables, se calculó la media aritmética de la variable edad. Para estudiar la asociación entre la edad y el riesgo oncogénico se utilizó el estadístico Chi-cuadrado (χ^2), se empleó una significancia de 0,05 y para comparar resultados de citología y PCR-RFLP se empleó la prueba Chi-cuadrado (χ^2) para muestras independientes.

RESULTADOS

Fueron estudiadas 43 pacientes con un promedio de edad de 22,9 años en edades comprendidas entre 17 y 41 años; 79,1% tenían edades inferiores a 25 años, (Tabla 1).

La técnica de PCR demostró que de las 43 muestras cervicales 34,9% (15/43) contenía ADN de VPH.

El análisis de tipificación viral en las muestras PCR positivas se observa en la Tabla 2. Se detectaron cinco genotipos diferentes de VPH, el más frecuente fué el VPH 6, con 46,7%, seguido del VPH 11, con 26,7%, el VPH 53, con 13,3% y el VPH 31 y 35, con 6,7% cada uno. No se encontraron casos de infecciones múltiples. La frecuencia del VPH por grupos de riesgo oncogénico fue de 73,4% (11/15) para los de bajo riesgo, 13,4% (2/15) para los de alto riesgo y 13,3% (2/15) para los de probable alto riesgo.

La relación del riesgo oncogénico del VPH con la edad de las pacientes se presenta en la Tabla 3. Destaca que el grupo etario, 20 a 24 años, presenta el porcentaje mayor de casos positivos 53,3% y que 100% de los casos con VPH de AR se presentaron en pacientes entre 18 y 24 años y 63,3% de los casos con VPH de BR ocurrieron en pacientes entre 20 y 24 años. No se encontró una relación estadísticamente significativa entre VPH por PCR y la edad ($\chi^2=2,92$; $p=0,7$).

Los resultados citológicos muestran 20,9% casos con VPH, mientras que con la técnica de PCR se detectaron 34,9% de casos con VPH. Sin embargo, al comparar la citología y la PCR como método diagnóstico de infección por VPH no se encontró una relación estadísticamente significativa χ^2 con corrección de Yates = 1,44; $p=0,2293$) entre los resultados de citología y los de PCR para diagnosticar VPH. La sensibilidad de la citología frente a la prueba por PCR como prueba de oro fue 60% y la especificidad de 100%.

DISCUSIÓN

El reconocimiento del cáncer cervical y las lesiones precursoras de alto grado son consecuencia de

la infección por algunos tipos de virus del papiloma humano, constituye en la actualidad uno de los avances más trascendentes para comprender la etiología de esta enfermedad. Este hallazgo ha abierto nuevas perspectivas en la prevención primaria y secundaria de esta neoplasia. En prevención primaria con el desarrollo de vacunas que demuestren su efectividad contra los tipos carcinogénicos del VPH en poblaciones específicas, combinado con la implementación de programas de educación sexual que lleven a reducir las conductas que incrementan el riesgo de infectarse. En prevención secundaria mediante el aumento de la exactitud de las pruebas de detección y la producción de vacunas terapéuticas.^{5,9,14} Para alcanzar estos objetivos las prioridades en la investigación del VPH deberían relacionarse con: el refinamiento de los métodos diagnósticos, definición precisa de su incidencia en la población, determinación de los genotipos circulantes, estudio de los genotipos asociados con la progresión a cáncer cervical, identificación de factores coexistentes que influirán en la transmisión de VPH y en su rol carcinogénico y tratamiento de la infección.^{1,3,9}

Este trabajo ofrece una visión de la frecuencia y tipos de VPH circulantes en muestras cervicales de una población de estudiantes de la Universidad de Carabobo, Núcleo Aragua.

La frecuencia total de VPH obtenida por PCR en las 43 estudiantes de la Universidad de Carabobo, Núcleo Aragua participantes en el estudio fue de 34,9%. Este resultado coincide con el reportado por Reigoza et al.²¹ en un estudio similar realizado en el Estado Carabobo, donde la presencia del genoma viral se identificó en 34,5% de las pacientes estudiadas y con las cifras señaladas por la OMS para el Caribe (35,4%).¹¹ Sin embargo, otros trabajos hechos en el país, citan valores de positividad para el virus que van desde 12,5% a 85%.^{20,22,23,26} Esta variabilidad en la frecuencia también se observa en investigaciones realizadas en otros países, donde reportan cifras entre 12% a 46%.^{10,15,26,35-38}

La existencia de divergencias epidemiológicas en cuanto a la frecuencia del VPH en distintas regiones del mundo es ya un hecho conocido.^{1,2,10,11} En efecto, las estadísticas reportadas por el WHO/ICO Information Center on HPV and Cervical Cancer,¹⁹ muestran que la frecuencia del VPH es muy variable entre una región y otra. En general, es alta en África y Latinoamérica y baja en Europa. Además, dentro de las mismas regiones también se observan variaciones: Holanda 3,9% vs

Tabla 1
Pacientes estudiadas según grupo etario. Universidad de Carabobo. Núcleo Aragua. Mayo- Agosto 2009.

Grupo etario (años)		n	(%)
	≤ 19	14	32,6
20	24	20	46,5
25	29	5	11,6
30	34	3	7
35	39	0	0
40	44	1	2,3
Total		43	100

Tabla 2
Infección por VPH en función del genotipo y grupo de riesgo oncogénico en estudiantes de la Universidad de Carabobo. Núcleo Aragua. Mayo - Agosto 2009

Genotipo	n	%
6 (BR) ¹	7	46,7
11 (BR)	4	26,7
31 (AR) ²	1	6,7
35 (AR)	1	6,7
53 (PAR) ³	2	13,3
Total	15	100

¹Bajo Riesgo; ²Alto riesgo; ³Probable Alto Riesgo

Tabla 3
Infección por VPH según edad y riesgo oncogénico en estudiantes de la Universidad de Carabobo. Núcleo Aragua. Mayo - Agosto 2009.

Edad (años)	Riesgo oncogénico						Total	
	BR		AR		PAR		n	%
	n	%	n	%	n	%		
≤ 19	2	18,2	1	50	1	50	4	26,7
20 24	7	63,6	1	50	0	0	8	53,3
25 29	1	9,1	0	0	1	50	2	13,3
30 34	1	9,1	0	0	0	0	1	6,7
35 39	0	0	0	0	0	0	0	0
40 44	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	11	73,3	2	13,3	2	13,3	15	

35,6% en Croacia; Costa Rica 30,2% vs Brasil 14,1%. Estas cifras se correlacionan con las de la incidencia de cáncer de cuello uterino en cada región.²

En el presente estudio se detectó un predominio de los tipos virales de bajo riesgo (73,4%), resultado que coincide con lo publicado por otros autores nacionales.^{22,26,41,42}

En esta investigación se encontraron cinco genotipos diferentes de VPH que en orden decreciente de frecuencia son: tipos 6, 11, 53, 31 y 33. Este hallazgo no coincide con los cinco tipos más frecuentes descritos para Suramérica y Latinoamérica en la población femenina general por el IARC,¹ el WHO/ICO Information Center on HPV and Cervical Cancer⁹ y Muñoz.¹⁰ Es de hacer notar que en ninguna de las muestras estudiadas se encontraron VPH 16 y 18, lo cual marca una discordancia con los datos epidemiológicos descritos en la bibliografía tanto nacional^{20,21,23,24,27} como internacional.^{1,2,10,16,17,19,30,35,38-40} No obstante, el predominio de la infección por VPH tipo 6 y 11 encontrado en este trabajo coincide con estudios realizados en el país.^{22,26,27,41,42} Los hallazgos de esta investigación confirman lo señalado en la literatura sobre la heterogeneidad en la distribución mundial de los tipos de VPH.^{1,2,4,10,11,16,40}

En relación a la presencia de VPH tipo 31 y 35, en ciertas muestras estudiadas, algunas investigaciones en el país reportan su presencia, aunque con frecuencias diferentes a las encontradas en este trabajo.^{21,27,28} A este respecto, investigaciones realizadas en grandes poblaciones señalan que los tipos 31 y 35 son más frecuentes en Latinoamérica que en otras regiones.^{2,4,10,11,43} Por otra parte, resulta importante resaltar la presencia del VPH 53, también encontrado en bajo porcentaje en trabajos realizados en el país^{21,27} y reportado como frecuente en América del Sur.^{1,2,16,17,38,39}

Es importante resaltar que, aunque los tipos virales de alto riesgo 31 y 35 y de probable alto riesgo (53) se presentaron en bajo porcentaje en este grupo poblacional, se deben considerar como tipos virales importantes debido a que han sido detectados en la población. Esto pudiera tener importancia epidemiológica local, ya que podría traducirse en un posible problema para el tratamiento con las vacunas disponibles hoy en día, las cuales son activas para los tipos de alto riesgo 16 y 18 y no tendrían quizás utilidad para el tratamiento de los virus encontrados en esta investigación.^{1,4,10,18}

Por otra parte, la presencia de todos los casos de VPH de alto riesgo en pacientes entre 19 y 24 años

de edad, indica que deben tomarse acciones de prevención y seguimiento de estas pacientes.^{1,3} Aún cuando la mayor parte de estas infecciones se resuelven de forma espontánea sin consecuencias en un periodo de 6 a 24 meses, un porcentaje de ellas podría progresar a lesiones más severas.^{1-3,5,7,9,14-16}

En distintas publicaciones internacionales se ha señalado que la frecuencia de la infección por VPH en la población general disminuye con la edad, reflejando el carácter de enfermedad de transmisión sexual de la infección. Los picos máximos han sido encontrados en mujeres menores de 25 años.^{1-4,7,9,10,17} coincidiendo con lo reportado en otros estudios realizados en el país.^{20,21,25,27} Los resultados de este trabajo concuerdan con estas afirmaciones. No obstante, no se encontró una relación estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre la positividad viral y la edad. Hay que observar que la disminución del número de pacientes en los grupos de edades mayores, afecta el análisis estadístico; en este estudio 79,1% de la población fue menor de 25 años.

En cuanto a la comparación entre el diagnóstico de VPH por citología y por PCR, en este estudio se encontró diferencias estadísticamente significativas, a diferencia de lo reportado en otros trabajos realizados en el país.^{21,23} Ahora, al analizar la validez de la citología como método de diagnóstico del VPH frente a la PCR, encontramos que la sensibilidad de la citología frente a la prueba molecular fue baja (60%) y la especificidad alta (100%), cifras que coinciden con las reportadas por Salazar.²⁸ Además estos resultados también se encuentran dentro del rango de variabilidad, bastante amplio, señalado en numerosos estudios que ubican la sensibilidad de la citología entre 56% y 86%, y la especificidad entre 58% y 98%.^{1,14, 23, 27,35} Estas diferencias pueden explicarse por: 1- la variabilidad existente entre los laboratorios y observadores; con relación a esto último Franco et al.⁴⁶ señalan que un tercio de los diagnósticos falsos-negativos se pueden atribuir a errores de interpretación de la lámina y los otros dos tercios a la calidad de la misma; 2- por el hecho de que el estudio citológico sólo detecta la presencia de los efectos citopáticos del virus, y la infección inicial (infección latente) precede largamente a estos, que sólo son detectados por métodos de determinación del ADN.^{1,3}

La alta frecuencia de la infección por VPH en la población estudiada y los resultados obtenidos en la tipificación que no reflejan aquellos reportados en otros trabajos, aún cuando no son extrapolables debido a lo pequeño de la muestra, hace necesario que se divulgue la importancia del problema para su prevención,

comenzando con campañas de información, despistaje ginecológico y citológico, además de detección viral en algunos casos. Finalmente se plantea la necesidad de realizar estudios más amplios en esta comunidad, a fin de determinar con mayor precisión la frecuencia de la infección y los genotipos circulantes, información que contribuirá al diseño de acciones permanentes de prevención primaria y secundaria del cáncer de cuello uterino en la comunidad estudiantil de la Universidad de Carabobo, Núcleo Aragua.

AGRADECIMIENTOS

A todas las estudiantes participantes; a la Coordinación General de Salud de la Universidad de Carabobo, Núcleo Aragua; a los Servicios Médicos de la APUC, Aragua; a la Dra. Trina Pérez y al Dr. Jesús Villarreal; al Laboratorio Genomik C.A. ubicado en Maracay, Estado Aragua por su apoyo en la realización de la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) International Agency for Research on Cancer (IARC). Handbooks on cancer prevention: cervix cancer screening. 2005;10. [Consultada enero 2011]. Disponible en: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/prev/handbook10/HANDBOOK10.pdf>
- 2) International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human papillomaviruses. 2007;90:1-670. [consultada enero 2011]. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol90/mono90.pdf>
- 3) Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, Sociedad Española de Citología y Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia. La infección por papilomavirus. Documento de consenso 2002. [Consultado febrero 2011]. Disponible en: http://www.aepcc.org/download/documentos/profesionales/consenso_vph_2002.pdf
- 4) Muñoz N, Bosch x, Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah, K, 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;348:518-527.
- 5) Bosch FX. Epidemiology of human papillomavirus infections: new options for cervical cancer prevention. *Salud Pública de Méx.* 2003; 45(3):326-339.
- 6) Muñoz N. Virus de papiloma humano y cáncer: prueba epidemiológica. *J Clin Virol.* 2000;19(1-2):1-5.
- 7) Sellers, J., Karwalajtys, T., Kaczorowski, J., Mahony, J., Lytwyn, A., Chong, S., et al. Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. *CMAJ.* 2003;168:421-425.
- 8) Shiffman MH, Castle P. Human Papillomavirus. *Epidemiology and Public Health. Arch Pathol Lab Medicine* 2003;127:930-934.
- 9) Serman F. Cancer cervicouterino: Epidemiología, historia natural y rol del virus del papiloma humano. Perspectivas en prevención y tratamiento. *Rev Chil Obstetr Ginecol.* 2002;67(4):318-323.
- 10) Muñoz N. The global burden of cervical cancer in Latin American and the Caribbean: perspectives for prevention. *Salud Pública de Méx.* 2007;49: 29-31.
- 11) WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in Americas. Summary Report 2009. [consultada febrero 2011]. Disponible en: www.who.int/hpcentre
- 12) PAHO. Human Papillomavirus vaccines: a new tool for cervical cancer prevention. PAHO. 2005. [consultada enero 2011]. Disponible en: <http://www.paho.org/English/AD/FCH/IM/HPV-FactSheet1.pdf> ciudad de Mérida, Venezuela. *Rev Biomed.* 2003;14:61-68
- 13) Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS). Anuario de Mortalidad 2009. República Bolivariana de Venezuela. 2009. [consultada noviembre 2011]. Disponible en: www.msds.gov.ve
- 14) Bosch F, De Sanjosé S, Castellsagué X. Virus del Papiloma Humano: riesgo oncogénico y nuevas oportunidades para la prevención. *An Sist Sanit Navarra.* 2001;24(1):7-14. [consultada enero 2011]. Disponible en: <http://www.cfnavarra.es/SALUD/ANALES/textos/vol24/n1/colab.html>
- 15) Moscicki A, Hills N, Shiboski S, Powell K, Jay N, Hanson E, et al. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *Jama.* 2001; 285(23):2995-3002.
- 16) Richardson H, Kelsall G, Tellier P, Voyer H, Abrahamowicz M, Ferenczy A, et al. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003;12:485-490.

- 17) Molano M, Van den Brule A, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A, et al. Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol.* 2003;158(5):486-494
- 18) Clifford G, Rana R, Franceschi S, Smith J, Gough G, Pimenta J. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(5):1157-1164
- 19) WHO/ICO. Information Centre on Human Papilloma Virus (HPV) and Cervical Cancer 2010. (base de datos en internet). [consultada febrero 2011]. Disponible en: <http://apps.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/DataQuerySelect.cfm>
- 20) Correnti M, Cavazza ME, Alfonso B, Lozada C. La infección por el virus del papiloma humano: un problema de salud pública en Venezuela. *VITAE Academia Biomédica Digital.* 2002;13. [consultada enero 2011]. Disponible en: <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=85&n=3575>
- 21) 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.
- 22) Contreras L, Correnti M, Avila M, Guerrero A, León A. Virus del papiloma humano (VPH) en contexto ecológico venezolano.(I): diagnóstico citológico y molecular. *Salus.* 2008;12(3):68-77.
- 23) Muñoz M, Mendoza J, Tellez 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
- 24) Alvarez M, Chiarello A, Espina E, Reigosa A, Marrero, M. Detección del virus del papiloma humano (VPH) en grupo de pacientes con sospecha clínica y/o anatomopatológica de infección por VPH. *Salus.* 2000; 4:19-26.
- 25) Alfonso B, Lozada E, Correnti M, Cavazza ME, Michelli P, Salma N. Detección del virus papiloma humano en muestras cervicales de una población de estudiantes de la universidad central de Venezuela. *Rev Fac Med.* 2003;26 (2):120-126.
- 26) De Guglielmo Z, Avila M, Correnti M, Veitía M, Cavazza ME. Evaluación, mediante RCP, de la infección por el virus de papiloma humano en muestras de pacientes con diagnóstico clínico o citológico. *Rev Obstet Ginecol Venez.* 2008;68(4):240-247.
- 27) Quintero M, Cruz J, Bastidas M, Márquez L, Puig J. Detección y tipificación del virus del papiloma humano (VPH) mediante PCR-RFLP. *Rev Obstet Ginecol Venez.* 2008;68(1):25-31.
- 28) Salazar E. Detección del virus del papiloma humano en pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas de cuello uterino. *Rev Obstet Ginecol Venez.* 2007;67(1):47-54.
- 29) Suárez C, Mijares A, Castillo L, Briceño J. Tipificación del VPH en cáncer de cuello uterino en la población venezolana. *Rev Venez Oncol.* 2006;18(4):221-225.
- 30) Sargent A, Bailey A, Almonte M, Turner A, Thomson C, Peto J, et al. Prevalence of type-specific HPV infection by age and grade of cervical cytology: data from the ARTISTIC trial. 2008;98(10):1704-1709.
- 31) Blandenier C, Montenegro E. Compendio de coloraciones histológicas. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas 2004: BOD.
- 32) Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 . Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. Forum Group. Members; Bethesda 2001 Workshop. *JAMA.* 2002; 287: 2141-9.
- 33) Coutlee F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapoint N, et al. Use of PGM1 primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiol.* 2002;40:902-907.
- 34) Davidson F, Simmonds P, Ferguson JC, Jarvis LM, Dow BC, Follett EA, et al. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *J Gen Virol.* 1995;76:1197-1204
- 35) Serrano M, Correa M, Medina O, Melgarejo D, Bravo M. Tipificación de virus del papiloma humano mediante secuencia directa en mujeres con citología normal. *Rev Col Cancerol.* 2003;7(4):18-24.
- 36) Sánchez M, Uribe F, Conde C. La infección por el virus del papiloma humano, un posible marcador biológico de comportamiento sexual en estudiantes universitarias. *Salud Pública de Méx.* 2002;44(5):442-447.
- 37) Suárez A, Esquivias J, Vidart J, Picazo J. Detección y tipificación mediante biología molecular del virus del papiloma humano en muestras genitales. *Rev Esp Quimioterap.* 2006;19(2):161-166.
- 38) Sijvarger C, González J, Prieto A, Messmer A, Mallimaci M, Alonio V, et al. Epidemiología de la infección cervical por virus Papiloma humano en Ushuaia: Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2006;38:19-24.
- 39) Aedo S, Melo A, Garcia P, Guzmán P, Capurro I, Roa J. Detección y tipificación de virus papiloma humano en lesiones preneoplásicas del cuello uterino mediante PCR-RFLP. *Rev Med Chile.* 2007;135:167-173.
- 40) Antonishyn N, Horsman G, Kelln R, Saggari J, Severini A. The Impact of the Distribution of Human Papillomavirus

Types and Associated High-Risk Lesions in a Colposcopy Population for Monitoring Vaccine Efficacy. Arch Pathol Lab Med. 2008;132:54-60.

41) Graterol I, Finol H, Correnti M. Virus del papiloma humano en lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) de cuello uterino. Tipificación y Ultraestructura. Rev. Soc. Venez. Microb. 2006;26:89-94.

42) Richani H, Castejón O. Diagnostico, evaluación y seguimiento del comportamiento epitelial latente del virus papiloma humano en pacientes con VPH.). Revista Electrónica de Portales Medicos.com. 2009;4(7).[consultada febrero 2011]. Disponible en: <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articles/1500/1/Diagnostico-evaluacion-y-seguimientodel-comportamiento-epitelial-latente-del-virus-papiloma-humano-en-pacientes-con-VPH.html>

43) Desposorio C, Rodríguez L, Castro A. Detección del virus del papiloma humano mediante reacción en cadena de la polimerasa y su relación con los resultados del PAP convencional. Mosaico Cient.2006;3(2):30-35.

44) Sanoja L. Estudio descriptivo de algunas variables epidemiológicas de las lesiones intraepiteliales escamosas de cuello uterino diagnosticadas por citología. Quinquenio 1997-2001.Laboratorio de anatomía patológica CDAP. Maracay, Estado Aragua. 2003. [Trabajo de Ascenso no publicado], Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud. Sede Aragua. Venezuela.

45) Alterio G, Mendoza I, Mendoza R, Peraza E, Pérez H, Sánchez A. Hallazgos citológicos y factores de riesgo para patología preinvasora e invasora de cuello uterino. Área de influencia del ambulatorio urbano tipo II "Dr. Rafael Pereira". Barquisimeto, Estado Lara (Venezuela).RESPYN 2007;8(3): .[consultada enero 2011].Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/viii/3/index.html>

46) Franco E. Duarte-Franco E. and Ferenczy A.; Cervical cáncer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. CMAJ. 2001;164(7):1017-1025.

Recibido: Enero, 2013 Aprobado: Julio, 2013
--

