

PRESENCIA DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) EN EL CUELLO UTERINO DE PACIENTES PROVENIENTES DE LA CIUDAD DE CUMANÁ, ESTADO SUCRE. ESTUDIO PRELIMINAR.

Melcencia Moreno, Aridays Oliveros, María Romero,
y Zhayda Durán*

PALABRAS CLAVES: papilomavirus, cáncer, neoplasia,
PCR, hibridación

RESUMEN

En los últimos años, algunos tipos de Virus de Papiloma Humano (VPH) han sido asociados con la displasia en cuello uterino y la neoplasia intraepitelial cervical, lo que permite involucrar al VPH en la génesis del cáncer genital. A pesar de la estrecha relación existente entre el papilomavirus humano y el cáncer de cuello uterino, en la región oriental de Venezuela no existen estudios previos acerca de la incidencia y los tipos de VPHs que afectan a nuestras mujeres, ya que la detección exacta del virus sólo es posible mediante las técnicas de Biología Molecular; las técnicas citológicas convencionales sólo llegan a detectar lesiones "sugestivas de VPH" lo que impide una adecuada toma de decisiones en el caso de pacientes con VPH de alto riesgo, propensas al desarrollo de carcinomas. Se aplicaron las técnicas de Biología Molecular (Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR e Hibridación en Placas) a 56 muestras de epitelio de cuello uterino de pacientes provenientes de la ciudad de Cumaná, Estado Sucre, con diagnóstico citológico de lesiones sugestivas de VPH y Neoplasia Intraepitelial Cervical en sus distintos grados (NIC I, II, y III), detectándose la presencia de VPH en el 64,28% de la población estudiada. El 61,11% de las pacientes que resultaron ser VPH positivas pertenecen a una condición socio-económica baja; de ellas, un 54,55% presentaron VPHs de alto riesgo, un 40,91% VPHs de bajo riesgo y un 4,54% la mezcla de los dos grupos. El resto de las pacientes VPH positivas se incluye dentro de la condición socio-económica media alta; de ellas, el 50% presentó VPHs de alto riesgo, un 28,57% VPHs de bajo riesgo y el 21,43% la mezcla de los dos grupos. En las pacientes VPH positivas coinciden además, los siguientes factores de riesgo: edad temprana de inicio de relaciones sexuales, numerosos embarazos, múltiples compañeros sexuales, tabaquismo y uso de anticonceptivos orales.

* Durán, Zhayda Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Escuela de Ciencias, Departamento de Biología. zduran @sucre.udo.edu.ve
Recibido: Enero 1997. Aprobado: Abril 1998.

ABSTRACT

In the last few years, several types of human papilloma virus (HPV) have been associated with dysplasias and cervical intraepithelial neoplasias, thus involving HPV in the genesis of genital cancer. In spite of the tight relation between HPV and uterine cancer, there are no studies, in the eastern region of Venezuela, on the incidence and types of HPV that affect women. The precise detection of the virus is possible only by using Molecular Biology techniques; conventional cytological techniques only detect "suggestive lesions of HPV". This prevents accurate diagnosis of patients with high risk HPV, these belong to the patients who may develop carcinomas. The Polymerase Chain Reaction (PCR), and subsequent hybridization, were undertaken with 56 samples taken from the uterus cervix epithelium of patients from Cumana, Sucre State, Venezuela, who showed "suggestive lesion of HPV" and cervical intraepithelial neoplasias in various grades (CIN I, II, III). Of the 56 samples, 64,28% were HPV positive. Of these, 61,11% came from lower middle class women: 54,55% showed high risk HPVs and 40,91% showed low risk HPVs, while 4,54% showed HPVs of both types. The rest of the sample came from upper middle class women: 50% showed high risk HPVs; 28,57% showed low risk HPVs, while 21,43% showed HPVs of both types. The following factors also coincided with the HPV positive patients: early sexual relations, high number of pregnancies, multiple sexual partners, smoking habits and use of oral contraceptives.

KEY WORDS: papillomavirus, cancer, neoplasia, PCR, hybridization.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino es una enfermedad de transmisión sexual considerada como una de las principales causas de mortalidad en la población femenina (Herrero *et al.*, 1990).

Estudios clínico-patológicos, epidemiológicos y moleculares han comprobado que el cáncer de cuello uterino es derivado de lesiones epiteliales con diferentes grados de atipia (Saragoni *et al.*, 1992). La identificación del Virus de Papiloma Humano (VPH) en cervix o cuello uterino ha adquirido un significado mayor a la luz de investigaciones que han demostrado que algunos de estos virus están asociados frecuentemente con cambios premalignos y malignos (Thompson *et al.*, 1992). Según Nyong'o (1991), el VPH es un probable iniciador de cambios en el epitelio cervical, lo cual posteriormente, con el transcurrir del tiempo, podría resultar en el desarrollo de epitelios cancerosos.

El VPH pertenece a la Familia Papovaviridae y es un virus icosaédrico, desnudo, con un cromosoma de ADN circular de doble cadena, siendo la partícula viral parcialmente termoestable y resistente a la desecación (De León *et al.*, 1992).

La infección es causada por una gran variedad de tipos de VPHs. Gracias al empleo de técnicas de biología molecular se conocen actualmente más de 60 tipos diferentes de VPHs, de los cuales más de 10 parecen infectar el tracto genital, entre otros: los VPHs 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 50, 51 y 60. Hasta ahora el ADN de pocos tipos de VPH ha sido encontrado integrado al ADN de la célula hospedera (Syrjänen y Syrjänen, 1990). En base a estas propiedades de integración y la frecuente detección en carcinomas invasivos, Meisels, según Saragoni *et al.*, (1992), clasifica los tipos de VPH en dos grupos: de bajo riesgo (VPHs 6, 11, 42, y 54) y de alto riesgo (VPHs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 y 58); atribuyéndosele un riesgo altamente significativo para el desarrollo de un cáncer invasivo a infecciones producidas por este último grupo.

Smotkin *et al.*, (1989) afirman que el ADN de los VPHs no oncogénicos casi nunca se encuentra en cánceres invasivos cervicales, pero no todos los ADNs de los VPHs oncogénicos se encuentran en todas las lesiones tumorales y con frecuencia puede detectarse aún en mujeres sanas desde el punto de vista citológico, colposcópico e histológico, lo cual sugiere que su presencia no necesariamente es suficiente para el desarrollo de un tumor (Herrero *et al.*, 1990).

En años recientes los casos de infección cervical por VPH han aumentado considerablemente. Esta infección tiene dos formas de presentación: La condilomatosa (clínica) y la no condilomatosa (sub-clínica); esta última, la más frecuente, es de difícil diagnóstico, requiriéndose experiencia y técnicas especializadas para tal fin. La

presentación sub-clínica constituye la primera etapa de una Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) y es la lesión más temprana capaz de progresar hacia el cáncer invasivo, por lo que se recomienda realizar un estudio exhaustivo de cuello uterino a toda paciente que presente una citología con cambios sugestivos de infección por VPH (Yordi *et al.*, 1992 a y b).

Se desconocen con exactitud los mecanismos de transmisión de estos virus, es probable que interactúen de forma aún no definida con otros factores como podrían ser las hormonas o los derivados del tabaco. Se han identificado factores de riesgo tales como: número elevado de compañeros sexuales, alto número de embarazos, tabaquismo, una alimentación poco balanceada (Herrero *et al.*, 1990), infecciones venéreas (Syrjänen y Syrjänen, 1990), edad temprana del inicio de las relaciones sexuales, uso de anticonceptivos orales, así como también un nivel socioeconómico bajo, que si bien no está relacionado directamente, parece influir sobre los factores anteriormente mencionados (De León *et al.*, 1992).

En Venezuela, los trabajos realizados para la detección de VPH en el cuello uterino mediante las técnicas de biología molecular son pocos. Entre ellos, la detección de ADN de los VPHs en casos de carcinoma cervical primario realizado por Rincón *et al.*, (1988) y el estudio de la prevalencia de la displasia cervical y la infección por VPH de acuerdo a la conducta sexual en una población indígena del Amazonas realizado por Azócar *et al.*, (1990).

En esta investigación se evaluó la presencia de la infección por VPH en el cuello uterino de pacientes provenientes de la ciudad de Cumaná, Estado Sucre, pertenecientes a dos estratos sociales (medio-alto y bajo) con diagnóstico citológico de lesiones sugestivas de VPH y Neoplasia Intraepitelial Cervical en sus distintos grados (NIC I, II, III).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. - Obtención de las muestras

Se tomaron 56 muestras de pacientes que asisten a consulta ginecológica en el Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá" (HUAPA) y algunas clínicas privadas de la ciudad de Cumaná, Estado Sucre. De estas pacientes, 36 presentaban diagnóstico citológico con lesiones sugestivas de VPH y Neoplasia Intraepitelial Cervical en sus diferentes grados (NIC I, II, y III) y en 25 no se registraron atipias en su diagnóstico citológico. A cada paciente se le aplicó una encuesta para evaluar los factores de riesgo mencionados anteriormente.

Las muestras se tomaron mediante hisopados cervicales, luego se guardaron a 4° C hasta su posterior traslado al Instituto de Oncología y Hematología de Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (M.S.A.S.) – Universidad Central de Venezuela (U.C.V.), donde fueron procesadas.

2. – Extracción del ADN de las muestras

El ADN de alto Peso Molecular (PM) se extrajo y purificó según el protocolo descrito por Sambrook *et al.*, (1989).

3. – Amplificación del ADN viral mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se tomaron 10µl de ADN purificado que se amplificó utilizando primers específicos para ADN-VPH (MY09 y MY11B), uno de los cuales está marcado en el extremo 5' por una molécula de biotina; estos primers delimitan una región de 450 pares de bases (pb) del gen L₁, región que se mantiene conservada entre los diferentes tipos de VPHs. Así mismo se incluyeron en la reacción de PCR, primers específicos para la β-globina como controles internos de la amplificación. Para el desarrollo del PCR se utilizó el programa descrito por Ting y Manos según Innis *et al.*, (1990).

El producto de la amplificación se analizó en un gel de poliacrilamida teñido con Bromuro de Etidio (BrE), posteriormente el tamaño del producto amplificado se visualizó con un trans-iluminador de luz ultravioleta (UV) y fue fotografiado para su registro permanente.

4. – Hibridación en placas

Se realizó un ensayo de hibridación molecular de captura (sandwich) que utiliza una detección colorimétrica. Una alícuota del producto amplificado y biotinilado en el extremo 5' se hibrida con sondas específicas de ARN de cadena sencilla. El híbrido resultante ADN-ARN es capturado a través de la biotina en el micropozo de la placa de captura, el cual está cubierto con estreptoavidina. Posteriormente el híbrido inmovilizado reacciona con un anticuerpo (Ac) anti-híbrido ADN-ARN conjugado con fosfatasa alcalina y detectado por un sustrato colorimétrico

La intensidad del color generado es proporcional a la cantidad de producto biotinilado, el cual se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm.

Se utilizaron patrones positivos de VPHs de alto y de bajo riesgo. Los valores de Densidad Óptica (DO) obtenidos en los patrones negativos permitieron establecer el límite de positividad de las muestras de los pacientes. La sonda de ARN que permite determinar VPHs de alto riesgo es una mezcla de los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y la sonda de bajo riesgo incluye los tipos 6, 11, 42, 43 y 44.

RESULTADOS

Los resultados de este estudio se presentan en las siguientes tablas:

TABLA Nº 1. – RESULTADOS DE VPH EN LAS PACIENTES ESTUDIADAS.

PROCEDENCIA	Número de Muestras	VPH+		VPH-	
		Nº	%	Nº	%
HUAPA	30	22	39,28	8	14,29
CLÍNICAS	26	14	25,00	12	21,43
TOTAL	56	36	64,28	20	35,72

TABLA Nº 2. – CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS DE LAS PACIENTES VPH+

PROCEDENCIA	NIC	SUGESTIVAS DE VPH	SIN ATIPIAS	TOTAL
HUAPA	11	8	3	22
CLÍNICAS	7	5	2	14
TOTAL	18	13	5	36

TABLA Nº 3. – GRUPOS DE VPH: DETECTADOS EN PACIENTES VPH+

PROCEDENCIA	NÚMERO DE PACIENTES	ALTO RIESGO (AR)		BAJO RIESGO (BR)		AR/BR	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
HUAPA	22	12	54,55	9	40,91	1	4,54
CLÍNICAS	14	7	50,00	4	28,57	3	21,43
TOTAL	36	9	52,78	13	36,11	4	11,11

TABLA Nº 4. – FRECUENCIA DE LOS RIESGOS EN LAS PACIENTES VPH+

FAC. RIESGO	ALTO RIESGO (AR)	BAJO RIESGO (BR)	ALTO/BAJO RIESGO (AR/BR)
Nº COMP. SEX.	≥3	≥3	≥4
Nº EMBARAZOS	≥4	3-5	≥3
EDAD 1º COITO	<18	17-20	≥16
Nº ABORTOS	1-3	0	2-3
ANTC. GINECOL.	E. VENÉREAS	NINGUNO	NINGUNO
USO ANT. ORAL	10 AÑOS	6 AÑOS	3 AÑOS
TABAQUISMO	MUY FRECUENTE	NUNCA - POCO	FRECUENTE
ALIMENTACIÓN	DEFICIENTE	ACEPTABLE	BALANCEADA

DISCUSIÓN

Al igual que en otros trabajos similares a éste, se encontró que la presencia de VPH de alto riesgo es mayor en pacientes pertenecientes a una condición socioeconómica media-baja, en quienes coinciden además, tres importantes factores de riesgo: el inicio temprano de relaciones sexuales, número elevado de compañeros sexuales y número elevado de embarazos. Se ha comprobado que estos factores aumentan la fragilidad del epitelio uterino, el cual se hace más susceptible de contraer la infección (Herrero *et al.*, 1990). Los otros factores de riesgo se encontraron en todos los grupos estudiados. Estos factores son el uso de anticonceptivos orales, el tabaquismo y deficiencias en la alimentación. Respecto a los anticonceptivos orales y a la deficiencia en la alimentación, se supone, que estos factores crean carencia de folatos, lo cual podría incidir en la aparición de características megaloblásticas en las células de la cervix (Herrero *et al.*, 1990).

En cuanto al tabaquismo, éste es asociado al comportamiento sexual, sobre todo en los casos de

consumo exagerado, lo que favorece la hipótesis que lo considera como factor de riesgo en la aparición del cáncer de cuello uterino.

Si asociamos los resultados de esta investigación, con un 64.28% de las pacientes estudiadas positivas para VPH, al hecho de que el cáncer de cuello uterino es el más frecuente en la mujer suresna, Rodríguez (1992), se concluye que este grave problema social y de salud pública se debe en gran medida a la presencia del VPH y su asociación con diferentes factores de riesgo, como ha sido verificado por varios autores (Herrero, *et al.*, 1990; Syrjänen y Syrjänen, 1990; Smith *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 1992; Saragoni *et al.*, 1992; De León *et al.*, 1992).

Es importante mencionar el alto grado de sensibilidad de las técnicas de biología molecular con respecto a las técnicas convencionales. En nuestro estudio, pionero en esta área en la región nor-oriental, cinco pacientes con citologías negativas (sin atipias) resultaron ser VPHs positivas: dos con VPHs de alto riesgo y tres con VPHs de bajo riesgo. Este resultado demuestra la importancia de realizar análisis empleando estas técnicas, las cuales evitan el diagnóstico de falsos negativos y permiten detectar con

precisión la presencia de ésta (u otra) entidad viral en una etapa temprana de la enfermedad, la cual, de esta forma, puede controlarse a tiempo evitando así su evolución o un estadio clínico-sintomático (Rodríguez, 1992).

Independientemente a los programas y métodos para la detección de la presencia de VPH, se debe hacer énfasis en la concientización de este problema, a fin de disminuir los factores de riesgo.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la Gobernación del Estado Sucre por el financiamiento de este trabajo, a las doctoras María C. Correnti y María E. Cavazza y la licenciada Nunciada Salma del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Oncología y Hematología (UCV - MSAS) por su valiosa asesoría, así como también a los doctores Haydeé Sánchez, Alicia Ceballos y Nelson Rivas, por su colaboración para la obtención de las muestras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZÓCAR, J.; ABAD, S.; ACOSTA, H.; HERNÁNDEZ, L.; GALLEGOS, A.; PUANO, E.; BIANCHI, R. & KRAMAR, A. 1990. Prevalence of cervical dysplasia and HPV infection according to sexual behavior. *Int. J. Cancer.*, 65:622- 625.
- DE LEÓN, M.; MIQUELENA, L. & ROMERO, C. 1992. Prevalencia de la infección por VPH, correlación clínica, citocolposcopia e histológica en mujeres sexualmente activas de 15 a 50 años. Trabajo de Pregrado. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Coro, Venezuela. 50 pp.
- HERRERO, R.; BRINTON, L.; REEVES, W.; BRENES, M.; TENORIO, F.; DE BRITTON, R.; GAITAN, E.; MONTALBÁN, D.; GARCÍA, M. & RAWES, W. 1990. Factores de riesgo de carcinoma invasor del cuello uterino en América Latina. *Bul. Sanit. Panam.*, 109 (1): 6-27.
- INNIS, M.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. & WHITE, T. 1990. PCR protocols. En: *Detection and typing of genital human papilloma viruses*. Ting, A. & Manos, B. (eds). Academic Press, Inc. USA. pp. 356-367.
- NYONGO, A. 1991. Human papilloma virus infection in dysplastic cervical smears based on the presence of koilocytes: A study of 286 cases. *East Afr. Med. J.*, 68(1): 21-24.
- RINCÓN, F.; CASTOR, M.; AZÓCAR, J. & RAMÍREZ, J. 1988. Secuencia de ADN del Virus de Papiloma Humano (VPH) en caso de carcinoma invasivo cervical primario. *Arch. Ven. Farmacol. Terap.*, 7 (1):24-32.
- RODRÍGUEZ, H. 1992. Cáncer del cuello uterino en el Estado Sucre. R.M.O. pp, 25-30.
- SAMBROOK, Y.; FITSEH, E. & MANIATIS, T. 1989. *Molecular Biology. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratories Press. pp. 540-550.
- SARAGONI, A.; MEDRI, L.; BACCI, F.; PADOVANI, F.; SABATTINI, E.; NANNI, O. & GAUDIO, M., 1992. Valoree della tecnica di ibridazzazione *in situ* nella diagnosi delle infezioni da papilloma virus umano della cervice uterina. Correlazioni fra i tipi di papilloma virus umano de aspetti morfologici. *Pathologica*; 84:57-66.
- SMITH, E.; JOHSON, S.; JIANG, D.; ZALESKI, S.; LYNCH, E.; BRUNDAGE, S.; ANDERSON, R. & TUREK, L. The assocoation betwen pregnancy and human papilloma virus prevalence. *Cancer Detect. Preven.* (5): 395-402.
- SMOTKIN, D.; PROKOPH, H. & WETTSTEIN, F. 1989. Oncogenic and noncogenic human genital papiloma viruses generate the E₇ mRNA by different mechanisms. *J. Virol.*, 63 (3): 1441 - 1447.
- SYRJÄNEN, K.. & SYRJÄNEN, S. 1990. Epidemiology of the human papilloma virus infections and genital neoplasia. *Scand. J. Infect Dit*, 69:7- 17.
- THOMPSON, C.; ROSE, B. & COSSART, Y. 1992. Detection of HVP DNA in archival specimens of cervical cancer using *in situ* hibridization and the Polymerase Chain Reaction. *J. Med. Virol.*, 36:5459.
- YORDI, K.; YORDI, A. & PÉREZ, M. 1992 a. Infección de cuello uterino por virus de papiloma humano. Estudio clínico epidemiológico. Hospital Universitario Luis Razetti, Barcelona. Jun-Nov. 1989. *Bol. VIII Jorn. Cient., Tecnol. y Educat.* p.21.
- . Infección de cuello uterino por virus de papiloma humano. Correlación de citología. colposcopia y biopsia. Hospital Universitario Luis Razetti. Barcelona. Jun-Nov. 1989. *Bol. VIII Jorn. Cient., Tecnol. y Educat.*, p. 22.