

Diagnóstico del virus de papiloma humano VPH 16 en mujeres de la ciudad de Loja

Franklin A. Román Cárdenas¹, Anabel Larriva Borrero², Pablo Ramón³, Paola Dalgo Aguilar³, Cesar Bedoya Piloso⁴, Yasel Santiesteban⁴, Eduardo Samaniego Cárdenas²

1. Centro de Biotecnología, Universidad Nacional de Loja, Ciudadela Universitaria Loja, Ecuador
2. Carrera de Medicina Humana UNL.
3. Universidad Técnica Particular de Loja.
4. Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública.

Correspondencia:

Franklin Román Cárdenas
Universidad Nacional de Loja.
Loja-Ecuador.

Email:

franklinroman11@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4382-5558>

Dirección: Isla Santa Cruz e
Isabela. Loja-Ecuador

Código Postal: 110150

Teléfono: [+593] 992088936

Fecha de recepción:

30-05-2020

Fecha de aceptación:

26-10-20

Fecha de publicación:

30-12-20

Membrete bibliográfico:

Román Cárdenas F: Diagnóstico del Virus de Papiloma Humano VPH 16 en mujeres de la ciudad de Loja

Rev. Med Ateneo 2020; 22

(2):11-20

Artículo acceso abierto

RESUMEN

Objetivos: Diagnosticar el VPH en mujeres de la ciudad de Loja, asociando los resultados de biología molecular a factores de riesgo sociodemográficos y, de la conducta sexual en un estudio experimental.

Métodos: Muestras de cepillado endocervical fueron recolectadas de mujeres de entre 18 y 60 años de edad, sexualmente activas, depositadas en solución salina y procesadas inmediatamente, la extracción del ADN se realizó con kit comercial (Invitrogen), la cuantificación mediante NanoDrop, como control interno se realizó la detección del gen de beta globina humana, para la detección de VPH se utilizó el juego de cebadores, MY11/09, generándose un amplicón de 450 pb perteneciente a la región L1, los amplicones se visualizaron en electroforesis de agarosa al 2% teñido con Syber Safe 1x.. Datos sociodemográficos y de comportamiento sexual fueron obtenidos mediante la aplicación de una encuesta-entrevista.

Resultados y conclusión: Se encontró una positividad a VPH 16 en mujeres que acuden a consulta de rutina del 35,6%, en mujeres en edades comprendidas entre los 18 y 25 años se encontró el 50% de positividad y entre los 26 y 30 años el 38.1 %, sin las medidas médicas oportunas y la persistencia del virus, entre 10 y 15 años podrían tener problemas premalignos y malignos.

Palabras clave: Virus del Papiloma Humano, enfermedad, transmisión sexual, oncogénica

ABSTRACT

Objectives: To diagnose HPV in women in the city of Loja, associating the results of molecular biology with sociodemographic risk factors and sexual behavior, in an experimental study.

Methods: Endocervical brushing samples were collected from women, between 18 and 60 years of age, sexually active, deposited in saline solution and processed immediately, the extraction of the DNA was carried out with a commercial kit (Invitrogen), quantification using the NanoDrop. As an internal control, the detection of the human beta globin gene was performed, for the detection of HPV, the primer set, MY11 / 09, was used, generating a 450 bp amplicon belonging to the L1 region. Amplicons were visualized in 2% agarose electrophoresis stained with Syber Safe 1x. Sociodemographic and sexual behavior data were obtained through the application of a survey-interview.

Results and conclusion: A positivity to HPV 16 was found in women who come to a routine consultation in 35.6%, in women between 18 and 25 years of age, 50% positivity was found, and Between 26 and 30 years old 38.1%, without the appropriate medical measures and the persistence of the virus, between 10 and 15 years old could have premalignant and malignant problems

Keywords: Human Papillomavirus, sexually transmitted disease, oncogenic.

INTRODUCCIÓN

El Virus del papiloma humano (VPH), es transmitido más frecuentemente por vía sexual, la infección por genotipos de alto riesgo son la principal causa para el desarrollo de cáncer cervicouterino y, un factor relevante para otros tipos de cáncer, orofaríngeo, del canal anal y de pene, en el caso de VPH de bajo riesgo la proliferación de verrugas genitales. Los genotipos de VPH 16 y 18 son responsables de alrededor del 70% de todos los casos de cáncer de cuello uterino en todo el mundo [1]. Las estimaciones actuales indican que cada año 527,624 mujeres son diagnosticadas con cáncer de cuello uterino y 265.672 mueren a causa de la enfermedad. En el Ecuador aproximadamente 1600 nuevos casos de cáncer de cuello uterino se diagnostican anualmente, el número por año de casos de cáncer de cuello uterino es de 2,094, el número anual de muertes por cáncer de cuello uterino es de 1,026, se clasifica como la segunda causa de cáncer femenino [2]. En Loja de acuerdo a datos del Registro de Tumores de Quito cada año se reportan cerca de 95 nuevos casos de cáncer de cérvix, lo que representa una tasa de incidencia de más 30 casos por 100.000 habitantes [3]. En conjunto con las tasas de Manabí, EL Oro y Guayas representan las más altas de cáncer de cérvix reportadas en el Ecuador [4-3]. Se desconoce porque estas poblaciones presentan tasas de morbi-mortalidad mayores que el resto de país quizá estén influyendo problemas asociados a la poca rutina de someterse a exámenes de detección, serán la conducta sexual y de comportamiento claves en los porcentajes de VPH altos en la zona de influencia de la investigación. La carencia de información hace necesaria la implementación de estudios de línea base que aborden estos problemas. Dentro de este contexto, la presente investigación pretende diagnosticar el Virus del Papiloma Humano en pacientes que acuden a consulta ginecológica sin antecedentes previos, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificando un fragmento de 450 pb de la secuencia del gen L1 y asociar los resultados de biología molecular a los factores de riesgo sociodemográficos, y de la conducta sexual.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras empleadas fueron colectadas en el marco del proyecto "*Dinámica de la infección del virus del papiloma humano y otras infecciones de transmisión sexual en mujeres de la provincia de Loja*". Fueron tomadas 101 muestras a partir de mujeres atendidas en centros de salud ginecológicos del Ministerio de Salud Pública (MSP) de la ciudad de Loja, se tomaron en cuenta los siguientes criterios de inclusión, mujeres de edad entre 18 y 60 años, sexualmente activas, a quienes también se les realizó una encuesta de comportamiento sexual luego de explicarles el objetivo de la investigación y, previa la firma del respectivo consentimiento informado de participación. El estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación INSPI- LIP de la ciudad de Quito, el cual está acreditado por la Autoridad Sanitaria del Ecuador.

Recolección y procesamiento de las muestras clínicas: Las muestras fueron recolectadas por un médico ginecólogo, depositadas en solución salina y puestas en refrigeración se transportaron inmediatamente al laboratorio de Biología molecular del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja para su procesamiento, la extracción del ADN total se realizó a través del kit comercial DNA Mini Kit (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La cuantificación del ADN se realizó mediante el Nano Drop. Como control interno para evaluar la calidad del ADN se realizó la detección del gen de beta globina humana empleándose los cebadores PCO3 y PCO4 que generan un producto de 110pb. Para la detección de VPH, mediante una PCR convencional se utilizó el juego de cebadores universales, MY11/09, la PCR se preparó para un volumen final de 25 μ l en una mezcla con 1x de Buffer, 1.5mM de MgCl, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 μ M de cada cebador MY11/09, 0.4 U de Taq polimerasa y 5 μ l de ADN, generándose un amplicón de 450 pb perteneciente a la región L1 del genoma viral. Los productos de PCR fueron visualizados mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con Sybr Safe 1x. Todos los reactivos empleados en el proceso de amplificación fueron de la marca Invitrogen (EE.UU). Las condiciones del ciclado se establecieron en: 94 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos de PCR (94 °C, 57 °C y 72 °C por 1 min cada uno) y 72 °C por 10 min. Como control de reacción se utilizó la mezcla de PCR con agua en lugar de ADN purificado. En el caso del control positivo, se utilizó una muestra positiva a VPH 16 proporcionada por investigadores de la Universidad Técnica Particular de Loja.

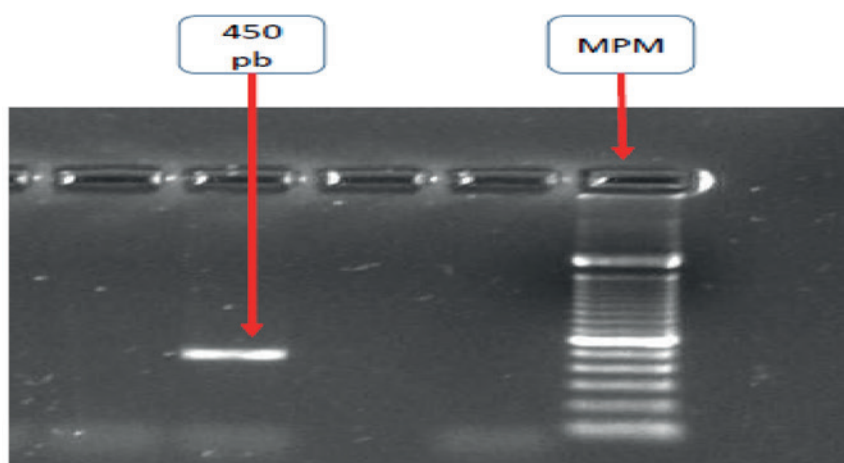


Figura 1. Vista de la amplificación del fragmento del gen L1 de 450pb

Datos sociodemográficos y clínicos: Los datos sociodemográficos y de comportamiento sexual fueron obtenidos mediante la aplicación de una encuesta-entrevista cuya confiabilidad fue medida por el coeficiente Alfa de Cronbach todos los cálculos se realizaron en el programa R (R Core Team), la encuesta-entrevista fue aplicada por los médicos psicólogos entre los datos solicitados: Procedencia, ciudad de residencia, situación laboral, estado civil, nivel de escolaridad, situación económica, historia sexual, las participantes en el estudio firmaron el respectivo consentimiento informado.

Análisis estadístico: Los datos demográficos de cada participante así como los resultados obtenidos del laboratorio fueron ingresados a una base de datos creada con el programa Microsoft Excel 2010; para ser llevados al programa SPSS en donde se realizaron los diferentes cálculos, tablas y gráficos.

RESULTADOS

Positividad a la prueba molecular

Se encontró una positividad a VPH mediante la prueba de PCR en mujeres que acuden a consulta de rutina en el 35,6% de las muestras

Tabla 1. Positividad a VPH en el estudio

Parámetro	Muestras	Porcentaje
Negativo	65	64,4
Positivo	36	35,6
TOTAL	101	100

Resultados de la positividad al VPH mediante la prueba de PCR y relacionada con los principales factores de riesgo de varios analizados en el estudio

Edad de las pacientes detectadas VPH positivas

De treinta y dos mujeres muestreadas en edades comprendidas entre los 18 y 25 años, el 50% son positivas a VPH.

Tabla 2. Rangos de edad en mujeres con positividad a la presencia de VPH

Rango/entre	Cantidad	Porcentaje	Muestras positivas VPH	Porcentaje
18-25	32	31,7	16	50
26-30	21	20,8	8	38,1
31-35	13	12,9	1	7,7
36-40	11	10,9	4	36,4
41-45	13	12,9	4	30,8
46-50	6	5,9	2	33,3
51-55	4	4,0	0	0,0
56-60	1	1,0	1	100
Total	101	100,0	36	

Ocupación de las pacientes detectadas VPH positivas

De trece mujeres muestreadas y que indican que su ocupación es ser estudiantes el 76,9%(10) son positivas a VPH, de 56 amas de casa el 32,1% (18), de 14 que mencionan ser empleadas domésticas el 37,5% (5), de 5 profesionales el 40,0% (2) son positivas a la prueba respectivamente.

Situación económica

De 66 y 35 mujeres que se catalogan en un nivel socioeconómico medio y bajo se encontró el 36,4% (24) y el 34,3% (12) de positividad.

Mujeres positivas a la prueba por estado civil

El mayor porcentaje de VPH detectado por la prueba molecular se encuentra en pacientes solteras en un 52% (12), casadas 24,4% (11), divorciadas 100%(5), en unión libre 28,6(8)

Resultados de la positividad al VPH mediante la prueba de PCR y relacionada con los principales factores de riesgo de varios analizados en el estudio

Edad del inicio de la actividad sexual.

Respecto de mujeres positivas a VPH considerando el inicio de la actividad sexual se determinó que el mayor porcentaje de positividad a VPH se encontró en mujeres que iniciaron la actividad sexual entre los 18 y 20 años, seguidas de las mujeres de edades comprendidas entre 15 y 17 años, en el siguiente cuadro se detalla los diferentes porcentajes de acuerdo a la edad.

Tabla 3. Positividad a VPH relacionada con la edad de la mujer a la primera relación sexual

Entre	Cantidad	Porcentaje	Muestras positivas VPH	Porcentaje
Antes de los 12 años	2	2	1	50
De 12 a 14 años	5	5	1	20
De 15 a 17 años	47	46,5	17	36,2
De 18 a 20 años	29	28,7	11	37,9
De 21 a 23 años	11	10,9	2	18,2
+24 años en adelante	7	6,9	4	57,1
Total	101	100	36	

Utilización de métodos (barrera) de protección en la primera relación sexual y posteriormente

Mujeres que utilizaron métodos de protección (barrera) al inicio de su primera relación sexual, tienen un porcentaje significativamente menor 25% (9) al diagnóstico de VPH respecto de las mujeres que no utilizaron métodos de protección 72,2% (26).

De 93 mujeres que no utilizan o utilizan preservativo a veces cuando mantienen relaciones sexuales tienen una positividad del 69% (32) y de 9 mujeres que manifiestan utilizar preservativos siempre el 44,4(4) son positivas.

Número de hijos a término

Se determinó que las mujeres muestreadas tienen entre uno y seis hijos; las que tienen entre

1 y 2 hijos, 3 y 4 hijos, 5 y 6 hijos, tienen un porcentaje de positividad a VPH del 32,0%(16), 29,2%(7), 50,0% (3) y se encontró en mujeres que no tienen hijos 50%. (10)

Múltiples parejas sexuales

En el estudio se encontró en mujeres que han tenido entre 2 y 4 parejas sexuales el 53,8%, con más de 5 parejas sexuales el 100% y, mujeres con una sola pareja el 32,2% de positividad a la prueba

Ha mantenido relaciones sexuales bajo el efecto de sustancias

De las pacientes diagnosticadas positivas a VPH el 58,8% manifiestan haber mantenido relaciones sexuales bajo los efectos de bebidas alcohólicas.

Ha mantenido relaciones sexuales con hombres enfermos con ITS

Dos pacientes manifestaron haber tenido relaciones sexuales con parejas positivas a enfermedades de transmisión sexual las dos son positivas a VPH.

DISCUSIÓN

La mayoría de las infecciones (detección de VPH positiva) se resuelven espontáneamente y no causan síntomas o enfermedades. En el estudio realizado en el 2008 por Valenzuela [5], en países de América Latina y del Caribe encontró una prevalencia de infección por VPH determinada mediante reacción de polimerasa en cadena (PCR), del 18,7%. Silva [6] y, colaboradores en el 2015 mencionan que los genotipos de VPH más prevalentes de la población femenina de la ciudad de Guayaquil son HPV-16 (29, 77%); HPV-52 (16, 18%); HPV-51 (12, 30%); HPV-6 (9, 71%); and HPV-59 (8, 74%). En el 2016 [7], en un estudio a partir de 1581 muestras cervicales en el Ecuador encontró ADN de HPV en el 43,58% de las muestras de estas muestras, 604 (38.20%) fueron positivas para un solo genotipo de HPV, mientras que 85 (5.37%) fueron positivas para múltiples tipos de HPV, el genotipo 16 (5,50%) resultó en el tipo detectado con más frecuencia en infecciones tanto únicas como múltiples, HPV 33 (4.55%) y HPV 11 (3.80%) ocuparon el segundo y tercer lugar en frecuencia entre todos los genotipos detectados. En la provincia del Azuay se reporta una prevalencia de VPH de 25.6%; 4.8% genotipos oncogénicos de bajo riesgo y el 20.8% genotipos oncogénicos de alto riesgo respectivamente [8]. En el estudio realizado por Dalgo [9], en el 2017 a partir de muestras de Citología cervical premaligna o maligna en mujeres de la región sur de Ecuador reporta que el 64,5% de las muestras analizadas fueron positivas para el VPH, siendo los genotipos 16 y 18 los más prevalentes (se detectaron 16 en 148 muestras y 18 en 108). Los genotipos 58 y 51 fueron los terceros.

En nuestro estudio se pudo determinar VPH 16 en el 35.6% (36) de las muestras, mediante la prueba de PCR, en mujeres entre 18 y 60 años que acuden a control de rutina a la consulta externa en los centros del ministerio de salud pública, sin embargo por rangos de edad se encontró, en mujeres en edades comprendidas entre los 18 y 25 años el 50% de positividad y entre los 26 y 30 años el 38.1%, lo que nos da una positividad del 88,1% entre los 18 y 30 años de edad, se diagnosticó en mujeres jóvenes de estado civil solteras una positividad del 52.2% del total el 76,6% son estudiantes. Los porcentajes del VPH 16 en mujeres de la provincia de Loja detectados por nuestro estudio son más altos que en Guayaquil y, muy por encima de los estudios realizados en Cuenca. En el 2017 Bedoya [10] y colaboradores reportan que el VPH

16, en nuestra población presenta dos linajes genéticos que co-circulan, estos son los linajes europeos y asiáticos; siendo los asiáticos de más alto riesgo oncogénico [11].

Este porcentaje alto de VPH 16 detectado en mujeres de Loja, posiblemente se deben a los factores de riesgo asociados, la edad a la primera relación sexual, que se ha identificado en este estudio que; mujeres que iniciaron su actividad sexual entre los 15 y 17 años, muestran una positividad del 36,2%, en mujeres de 18 a 20 años el 37,9%, la no utilización de métodos barrera que identifica el estudio una positividad del 72%, sumado al número de parejas sexuales durante el último año, mujeres que han mantenido relaciones sexuales con 2 a 4 parejas se encontró una positividad del 53,8% y en mujeres con más parejas sexuales la positividad aumenta llegando al 100%, en mujeres que han mantenido relaciones sexuales bajo los efectos de sustancias especialmente consumo de alcohol se determinó un 58,8% de positividad, en mujeres que han mantenido relaciones sexuales con personas con enfermedades de transmisión sexual el 100% de los casos presenta positividad a la prueba de VPH.

Pese a que la progresión de la enfermedad por lo general toma muchos años [12]. Los altos índices de VPH 16 identificados en Loja, más los factores de riesgo y sin la aplicación de las medidas adecuadas podría ocasionar en la población joven diagnosticada problemas sanitarios de consideración.

CONCLUSIONES

La positividad de VPH encontrada en base a la prueba de PCR (35,6%) se corresponde al genotipo VPH 16, una infección persistente podría conducir al desarrollo de cáncer cervicouterino.

El mayor porcentaje se encuentra en mujeres entre los 18 y 25 años sin las medidas médicas oportunas y la persistencia del virus, entre 10 y 15 años podrían tener problemas premalignos y malignos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ICO/IARC HPV Information Centre Human Papillomavirus and Related Diseases Report in Ecuador 2017 disponible en <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/ECU.pdf>
2. ICO/IARC HPV Information Centre Human Papillomavirus and Related Diseases Report in Word 2017 disponible en <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>
3. Registro Nacional De Tumores / National Cancer Registry. Epidemiología del cáncer en Quito 2006-2010. (P. Cueva & J. Yépez, Eds.) (15th ed.). Quito: Sociedad de Lucha contra el Cáncer, Quito Ecuador 2014
4. Bruni, L., Barrionuevo-Rosas, L., Serrano, B., Albero, G., Mena, M., Gómez, D. de San José, S. Human Papillomavirus and Related Diseases Report - Ecuador. HPV Information Centre 2016
5. Valenzuela M T, De la Hoz F, Koumans E, Posso H, Cavada G, Urquidi C, et al. Carga de enfermedad relacionada con el virus papiloma humano en países de América Latina y El Caribe. Towards Comprehensive Cervical Cancer Prevention and Control Región of the Americas, México City, 12-13 May, 2008
6. Silva G, Altamirano F, Montenegro W, Silva R Prevalence and Molecular Epidemiology of Human Papillomavirus in Ecuadorian Women with Cervical Cytological Abnormalities. J Data Mining Genomics Proteomics 6:174. doi: 10.4172/2153-0602.1000174 2015
7. García Muentes GD, García Rodríguez LK, Burgos Galarraga RI, Almeida Carpio F, Ruiz Cabezas JC. Genotypes distribution of human papillomavirus in cervical samples of Ecuadorian women. Rev Bras Epidemiol [Internet]. 2016;19(1):160–6. disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27167657>
8. Cabrera J., Cárdena O., Campoverde M., Ortiz J. Prevalencia de genotipos del papiloma virus humano en mujeres de la provincia del Azuay, Ecuador. Disponible en <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/22281/1/MASKANA%206107.pdf>
9. Dalgo A. P, Lojan G. C. Córdova R A., Acurio P., K., Arévalo A., Bobokova J. Prevalence of High-Risk Genotypes of Human Papillomavirus: Women Diagnosed with Premalignant and Malignant Pap Smear Tests in Southern Ecuador Published online 2017 Jun 22 disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5498899/>
10. Bedoya-Pilozo C et al Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of human papillomavirus infection in women with cervical lesions and cancer from the coastal

region of Ecuador Vol. 50. Núm. 2. Revista Argentina de epidemiología Páginas 136-146 (Abril - Junio 2018) disponible en <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-argentina-microbiologia-372-avance-resumen-molecular-epidemiology-phylogenetic-analysis-human-S0325754117301372>

11. Burk RD, Harari A, Chen Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology* 2013; 445 (1–2):232–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.018>
12. WHO World Health Organization Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer 2018 disponible en [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer)

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Franklin A. Román Cárdenas (FR) Anabel Larriva Borrero (AL) Pablo Ramón (PR) Paola Dalgo Aguilar (PD) Cesar Bedoya Piloso (CB) Yasel Santiesteban (YS) Eduardo Samaniego Cárdenas (ES)

ES: Recolección de muestras y llenado de encuestas, FR: Procesamiento de muestras, AB-YS: Acompañamiento psicológico pacientes, PD: Estandarización PCR, PR: Análisis estadísticos. FR-ES-AL Redacción del artículo

INFORMACIÓN DE LOS AUTORES

Franklin Román: Biotecnólogo molecular del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja

Anabel Larriva: Docente Investigadora de la Universidad Nacional de Loja

Eduardo Samaniego: Especialista en Ginecología y Obstetricia. Docente Investigador de la Universidad Nacional de Loja y médico del Ministerio de Salud Pública

Pablo Ramón: Estadístico. Docente de la Universidad Técnica Particular de Loja

Paola Dalgo Aguilar Biotecnóloga molecular Docente de la Universidad Técnica Particular de Loja

Cesar Bedoya Piloso: Investigador del Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación

Yasel Santiesteban: Investigador del Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación

FINANCIAMIENTO

La investigación fue financiada por la Universidad Nacional de Loja

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Loja por el apoyo con sus investigadores, infraestructura, laboratorios, al personal administrativo de la Dirección de Investigación y demás departamentos

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

CONSENTIMIENTO INFORMADO

La información recolectada fue guardada con absoluta confidencialidad y fue utilizada únicamente para el presente estudio, sin revelarse la identidad de los pacientes.

CONSENTIMIENTO PARA LA PUBLICACIÓN

Los autores cuentan con la autorización respectiva para la publicación en la revista Ateneo Vol. 22, 2