

Infección Persistente por Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo. Observación de una Cohorte. Mérida. Venezuela.

Luis Téllez¹, Elvia Michelli^{1,2}, José Andrés Mendoza¹, Silvana Vielma¹, María-Eugenia Noguera³, Diana Callejas⁴, María Cavazza⁵, María Correnti⁶

¹Universidad de Los Andes, Departamento de Microbiología, Mérida, Venezuela; ²Universidad de Oriente, Escuela de Ciencias, Departamento de Bioanálisis, Sucre, Venezuela. ³Universidad de Los Andes. Departamento de Ginecología y Obstetricia. Mérida, Venezuela. ⁴Universidad del Zulia. Laboratorio Regional de Referencia Viroológica, Maracaibo, Zulia. ⁵ Instituto de Biomedicina, MPPS, Caracas, Venezuela. ⁶ Instituto de Oncología y Hematología, MPPS, Caracas, Venezuela.

Autor de correspondencia: Luis Téllez. Avda. Don Tulio, Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología. Universidad de Los Andes. Mérida, 5101. Venezuela. Correo electrónico: letellezenator@gmail.com

Correos electrónicos:

| | |
|--|-----------------------|
| Luis Téllez: letellezenator@gmail.com | Tel: + 58 274 2403150 |
| Elvia Michelli: elviamichelli@yahoo.com | Tel: + 58 4247507789 |
| Jose A. Mendoza: joseandres@ula.ve | Tel: + 58 274 2403150 |
| María E. Noguera: avenog@hotmail.com | Tel: + 58 4147440023 |
| Silvana Vielma: vielmasa@ula.ve | Tel: + 58 274 2403545 |
| Diana Callejas: enmanuel2312@yahoo.com | Tel: + 58 414 3608290 |
| María Cavazza: cavazzaster@gmail.com | Tel: + 58 2128608840 |
| María Correnti: mcorrentip@yahoo.com | Tel: + 58 2126050647 |

Resumen:

Lesiones cervicales han sido asociadas a infección por Virus Papiloma Humano de Alto Riesgo Oncogénico (VPHAR). En 409 mujeres > 15 años se identificaron lesiones, VPHAR. En una cohorte de esta población se evaluó la infección persistente y las lesiones citológicas, colposcópicas e histopatológicas. Se tomaron cepillados cervicales y se aisló el ADN. Se detectó VPH por PCR de la región E6/E7. La genotipificación se realizó por PCR nested múltiple E6/E7. VPH se detectó en un 37,40% (153/409). VPHAR en 86%, (153/178), VPH18 46,64% (83/178), VPH16 34,28% (61/178). 53,93% (96/178) fueron infecciones múltiples, VPH18/16 (30/96) fue la más frecuente 31,25%. La citología mostró cambios en 15% de pacientes positivas. Un 49,67% de mujeres positivas para infección con VPH mostró anormalidad en el estudio colposcópico, relación que resultó estadísticamente significativa ($p < 0,0019$ test χ^2). 85% de mujeres positivas fueron menores de 45 años. 57 pacientes fueron evaluadas 15 meses después del estudio base, con prevalencia inicial de morbilidad 49,12% (28/57) y al final 10,53% (6/57), mostrando en 89,29% (25/28) negativización de la infección por VPHAR. 10,34% (3/28) mostró persistencia de

infección. 17,54% (10/57) presentó alteraciones citológicas, con 80% de positividad para VPH y una regresión del 100% (10/10) de las lesiones previamente diagnosticadas. Colposcópicamente, 50% (14/28) presentaron alteraciones relacionadas a VPH, de éstas, 85,71% (12/14) evidenciaron regresión de dicha alteración. La incidencia acumulada para VPH fue 10,34% (3/29). La tasa de incidencia fue 4,23% (3/71), lo que es igual a 4,23 casos nuevos de infección por VPH por cada 100 personas, por año de seguimiento. En conclusión el presente trabajo muestra una elevada frecuencia de infección por VPHAR, con predominio de VPH18 y 16 y en general de infecciones múltiples. La colposcopia resultó mejor predictor que la citología para infección. El estudio de seguimiento permitió observar un bajo porcentaje de infección persistente, y una elevada frecuencia de negativización de la infección viral, elevada regresión de lesiones citológicas y colposcópicas, una incidencia acumulada baja y una tasa de incidencia similar a la reportada por otros países latinoamericanos y superior a países europeos.

Palabras clave: Virus Papiloma Humano, Reacción en Cadena de la Polimerasa, Infección persistente

Antecedentes

El cáncer cervical (CC) fue relacionado con la infección por VPH en la década de 1970, cuando surgió la hipótesis propuesta por el Doctor Harold zur Hausen de que éste podría ser causado por infecciones con el virus identificado en los condilomas acuminados (1). En el año 2009, al Dr. zur Hausen se le otorgó el Premio Nobel de Medicina por esta novedosa idea, y por demostrar la presencia del genoma de VPH en tejido de CC (2). La infección cervical por genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico (VPHAR), está estrechamente ligada al diagnóstico de lesiones pre-invasoras y a CC invasivo; reportándose al respecto que aproximadamente el 80% de estos casos pueden ser asociados a infecciones por los genotipos de VPHAR 16, 18, 45 y 31 (3).

Actualmente, el CC representa el cuarto tipo de cáncer más común en la población femenina, constituyendo una causa importante de morbilidad y mortalidad, con una incidencia de aproximadamente 528.000 nuevos casos y una ocurrencia de 266.000 defunciones a nivel mundial durante el año 2012; alrededor del 80% de estos casos afecta a mujeres que residen en países en desarrollo, donde el CC totaliza el 12% de las neoplasias diagnosticadas, y el 7,5% de las muertes en la población femenina. Así mismo, se ha determinado que América del Sur está incluida entre las regiones de mayor riesgo para el desarrollo de CC, con una tasa estandarizada por edad de 31,5/100.000 mujeres (4).

Estudios realizados en el transcurso de los últimos diez años, han mostrado que la prevalencia de la infección por VPH en nuestro país es superior al 25%, tanto en mujeres asintomáticas para patología cervical como en las que tienen algún grado de anormalidad citológica diagnosticada (5-7). De acuerdo a las estadísticas del registro Nacional de Tumores del Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) de Venezuela, el CC es la segunda causa de muerte en las mujeres venezolanas entre 15 y 76 años de edad; además se

ha reportado que, en nuestro país, cada año se diagnostican aproximadamente 4.000 casos de CC y 1.700 mujeres mueren por esta patología (8, 9).

La progresión de las lesiones relacionadas a la infección cervical por VPHAR hasta CC, ocurre sólo en un pequeño porcentaje de las mujeres afectadas, debido a que en su mayoría estas infecciones son autolimitantes, siendo el tiempo promedio para su resolución de 6-18 meses; en estos casos la mujer no expresa síntomas clínicos y el área infectada es citológica y colposcopicamente normal. Una posible explicación a dicho planteamiento esta basada en el hecho de que algunos genotipos de VPH son más persistentes que otros, habilidad que está codificada genéticamente y, por tanto, asociada a su patogenicidad (2).

Las infecciones persistentes por VPH tienen una elevada probabilidad de evolucionar a cáncer, si los genotipos asociados a la misma están incluidos en el grupo de alto riesgo oncogénico, debido principalmente a que la persistencia puede inducir cambios genéticos secundarios, dada la interferencia de las oncoproteínas virales en los puntos de control del ciclo celular, y su habilidad para inducir la inmortalización de los queratinocitos (10-12). En este sentido, se ha reportado que en las pacientes con infecciones por VPHAR que permanecen en el tiempo, alrededor de un tercio de las NIC III progresan a CC invasivo entre 10 a 20 años, por lo cual estas lesiones suelen ser el blanco de los programas de cribado para la prevención y detección temprana del CC (13).

De acuerdo con los conceptos anteriormente expuestos, se consideró importante realizar un estudio clínico epidemiológico prospectivo de cohorte, dirigido a establecer la prevalencia de infección cervical por VPH, evidenciar las posibles asociaciones existentes entre la infección por VPHAR y la progresión hacia diferentes grados de severidad de las lesiones citológicas y colposcópicas detectadas y evaluar la persistencia de la infección por VPH y de las lesiones cervicales mediante el estudio de una cohorte, lo que contribuye al conocimiento de la realidad epidemiológica en cuanto al comportamiento de la infección por este agente viral, su repercusión sobre el estado de salud de las mujeres de nuestra comunidad, y la evaluación de la progresión o resolución de las lesiones cervicales asociadas a VPH.

Métodos

Tipo de estudio: En el presente estudio clínico epidemiológico se siguió un diseño experimental de cohorte, de tipo prospectivo concurrente.

Muestra poblacional: Para el desarrollo de la investigación se seleccionaron al azar 409 mujeres con edades comprendidas entre 15 y 69 años de edad, sexualmente activas o que habían iniciado actividad sexual, que asistieron a la consulta de ginecología del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA) del estado Mérida- Venezuela, durante el lapso de tiempo en el cual se realizó el estudio.

Criterios de inclusión y exclusión: Se incluyó en la investigación a mujeres consultantes en el servicio de ginecología sometidas a una rutina de despistaje semestral, anual o bianual. Así mismo, se excluyó del estudio a todas las mujeres que, para el momento de la

entrevista y toma de muestras, presentaron sangrado genital por menstruación normal, metrorragia o menorragia, y a las que presentaron cambios en el cuello uterino debidos a procedimientos quirúrgicos que impidieron la correcta toma de muestra. De igual forma se excluyeron mujeres con embarazo diagnosticado y mujeres seropositivas por VIH, o bajo tratamiento inmunosupresor.

Normas bioéticas: A todas las participantes seleccionadas y a los padres y/o representantes de las menores de edad, se les explicó acerca de la naturaleza e importancia del estudio, e informó que el mismo sería realizado siguiendo los principios establecidos por la Organización Mundial de la Salud para investigaciones médicas en seres humanos (14); además, se les solicitó su autorización mediante consentimiento previa información. El protocolo de trabajo fue evaluado y avalado por el Comité de Bioética del Instituto de Biomedicina, Ministerio del Poder Popular para la Salud y por el Consejo de Facultad de Medicina, ULA, Mérida.

Protocolo de seguimiento: A 57 de las mujeres participantes en el estudio, se les aplicó un protocolo de seguimiento durante 15 +/- 5 meses, distribuidas según los reportes de la detección de VPH, citológico y colposcópico, para evaluar la aparición y/o evolución de posibles modificaciones patológicas endocervicales, y su asociación con la incidencia y persistencia de las infecciones por VPH, identificadas en este grupo de pacientes.

Toma de muestras: A todas las participantes se les hizo una evaluación ginecológica, la cual fue realizada por personal médico calificado; el reporte de este estudio se registró en una ficha clínica diseñada para tal fin.

Se obtuvieron muestras de hisopados cervicales, para su posterior procesamiento por la técnica de Papanicolaou. Los resultados se expresaron según los términos establecidos en la clasificación de Bethesda, a saber: negativo para lesiones intraepiteliales o malignidad; células escamosas atípicas (ASC), incluye células con alteraciones que no son claramente pre-cancerosas; células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS), involucra todas las células que se encuentran entre los cambios celulares benignos y la lesión intraepitelial; células escamosas atípicas que no excluyen una lesión de alto grado (ASC-H); lesión intraepitelial de bajo grado (LIE BG), comprende los casos de displasia leve/NIC I, y los cambios celulares asociados a infecciones por VPH; lesión intraepitelial de alto grado (LIE AG), cambios celulares asociados a displasias moderadas o severas/NIC II, NIC III, y carcinoma *in situ* (15).

Se tomó una segunda muestra cervical con un escobillón, empleando el estuche DNA collection device (Digene® Corporation, Gaithersburg, MD, EE UU); éstas se utilizaron para el aislamiento de ADN y la identificación de infecciones cervicales por VPH.

Muestra de biopsias cervicales: Las muestras de biopsias de cuello uterino, de las 41 pacientes que presentaron lesiones cervicales al momento del examen ginecológico, fueron obtenidas por el médico ginecólogo; una porción del tejido fue incluida en formol al 10%, para su posterior análisis histológico, y otra porción se colocó en medio de lisis ATL (QIAGEN®), y se congelaron a -70 °C, hasta su procesamiento. Los resultados se expresaron según los términos establecidos en la clasificación establecida por el Instituto

Nacional del Cáncer de EE UU (NCI, de sus iniciales en inglés National Cancer Institute). Esta evaluación se llevó a cabo aplicando la tinción con Hematoxilina-Eosina a los cortes tisulares, y permitió evidenciar la presencia de lesiones histopatológicas. La NIC se divide en los grados I, II y III. NIC I corresponde a la displasia leve, NIC II a la displasia moderada y NIC III a la displasia grave y cáncer *in situ* (15).

Evaluación colposcópica: A todas las participantes en el estudio se les realizó un examen colposcópico de cérvix, vagina y vulva. Se utilizó la nomenclatura internacional establecida por la Federación Internacional para Patología Cervical y Colposcopia (IFCPC, de sus iniciales en inglés International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy), para clasificar los patrones colposcópicos observados (16). En función a esta clasificación, las pacientes se ubicaron en las siguientes categorías: hallazgos colposcópicos normales; hallazgos colposcópicos anormales, aquí se ubican todas las observaciones atípicas, divididas a su vez en alteraciones colposcópicas menores y mayores. Las atípicas menores comprenden epitelio acetoblanco plano, mosaico fino, punteado fino y epitelio parcialmente positivo al yodo. Por otra parte, las mayores incluyen epitelio acetoblanco denso, mosaico grueso, punteado grueso, epitelio yodo negativo y vasos atípicos; características colposcópicas sugestivas de cáncer invasivo; colposcopia insatisfactoria y hallazgos misceláneos (condiloma, queratosis, erosión, inflamación, atrofia, decidualosis y pólipos).

La evaluación colposcópica de las pacientes se incluyó como una herramienta para el diagnóstico de rutina de atípicas cervicales, de acuerdo con los parámetros propuestos para Venezuela en la Reunión de Consenso en Virus del Papiloma Humano, 2008, publicados en la Gaceta Médica de Caracas (17).

Procesamiento de las muestras para el diagnóstico de VPH

Aislamiento de ADN: Se utilizó el estuche comercial de extracción QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN®), de acuerdo con las instrucciones del laboratorio fabricante.

Cuantificación del ADN extraído: La concentración del ADN extraído fue determinada por espectrofotometría, a 260 nm, utilizando para ello el fotómetro UV1101/1101T (Biotech, Cambridge, UK).

Amplificación de los fragmentos de ADN VPH específicos por nested-PCR múltiple, región génica viral E6/E7: Esta técnica se aplicó para la detección y genotipificación de VPH. La primera reacción permitió la detección de secuencias específicas de ADN de VPH, contenidas en una región conservada de los genes tempranos *e6/e7*, utilizando para ello los pares de iniciadores de consenso GP-E6-3F/5B/6B, de acuerdo con el protocolo descrito previamente por Sotlar *et al.*, 2004 (18). Como control interno de la reacción se amplificó un fragmento de aproximadamente 248 pb del gen de la b-globina humana (19) y como el control VPH positivo se utilizó el oligonucleótido de ADN-VPH comercial, HPV-C001 (Maxim Biotech, Inc). Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl, conteniendo 100 ng de ADN genómico total, 10 µl de HotStarTaq® Master Mix 2X y 400 nM de cada oligonucleótido. (Figura 1)

La PCR múltiple, en formato nested, permitió la identificación de los genotipos virales de alto riesgo oncogénico VPH16, 18, 31, 33, 45, 52, 56 y 58, y de bajo riesgo VPH6/11 (18).

En este ensayo para la mezcla de reacción se utilizó 10 µl de HotStarTaq® Master Mix 2X y 400 nM de cada oligonucleótido; como ADN blanco se tomó 2 µl a partir de la dilución 1/10 del producto de la PCR GP-E6/E7, en un volumen final de 25 µl. Controles VPH positivos: se utilizó en cada reacción realizada los oligonucleótidos de ADN-VPH comerciales, HPV-C001 para VPH16/18, HPV-4011-18 para VPH18, HPV-4009-33 para VPH33, y HPV-4012-11, para VPH11, todos de Maxim Biotech, Inc. Los otros genotipos identificados se evaluaron a partir del peso molecular del amplicon obtenido en la PCR, según su ubicación en el gel de agarosa, en comparación con el marcador de peso molecular utilizado. (Figura 2)

Todas las amplificaciones anteriormente descritas, se procesaron en un Termociclador modelo ABI 2400 (Applied Biosystems). Para visualizar los productos de reacción, éstos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,20%, con 10 µl de bromuro de etidio/100 ml de agar, y posterior iluminación con luz UV. En la corrida electroforética se incluyó un marcador de peso molecular de 1.000 pb, escalera de 100 pb (100 bp DNA Ladder, Invitrogen) y el buffer 10X blue juice™ gel loadin buffer (Invitrogen) para verificar el tamaño de las bandas obtenidas.

Definición de infecciones persistentes por VPH: Se tomó como una infección persistente la positividad para el mismo genotipo viral en dos tiempos puntuales: en la primera evaluación realizada y en la que se llevó a cabo 15 meses después. Es importante señalar que todas las pacientes incluidas en el seguimiento expresaron ser sexualmente activas; razón por la cual no se evaluó el parámetro “abstinencia sexual”.

Recolección y Análisis de los datos: Se construyó una base de datos en el programa EPI Info 2012, versión 7.0, el cual se utilizó para el análisis estadístico descriptivo de los resultados, distribución de frecuencia de las infecciones por VPH de alto y bajo riesgo y asociación en escalas cualitativas de los diversos grupos identificados, con variables clínicas y epidemiológicas de las pacientes, las cuales se resumieron en proporciones. El análisis estadístico inferencial y la definición de asociaciones significativas se realizó mediante la prueba Chi-cuadrado. Se determinaron los indicadores Tasa de incidencia o densidad de incidencia, calculada como el cociente entre el número de casos nuevos de una enfermedad ocurridos durante el periodo de seguimiento y la suma de todos los tiempos individuales de observación e incidencia acumulada, referida a la proporción de personas candidatas que desarrollan la enfermedad durante el periodo de observación (20).

Resultados:

Frecuencia de detección de infección por Virus Papiloma Humano

De 409 mujeres estudiadas, en el 37,40% se detectó ADN de VPH a partir de muestras cervicales (Tabla 1).

Distribución de frecuencias de la infección por VPH por grupos de edad

El 85% de las infecciones por VPH se presentaron en mujeres menores de 45 años de edad, se observó un porcentaje similar en mujeres de 15 a 24 años de edad y las de 25 a 34 años (Gráfico 1).

Frecuencia de genotipos de VPH encontrados en las 153 muestras positivas para infección

Un 85,96% de los VPH encontrados, correspondieron a genotipos de alto riesgo oncogénico, de éstos el 80,92% fueron genotipos VPH16 y 18, con un porcentaje de 34,28 para el primero y 46,64 para el segundo (Tabla 2).

Frecuencia de infecciones únicas y mixtas por genotipos de VPH encontrados en 153 muestras cervicales

Del total de genotipos encontrados el 53,93% (96/178) correspondió a infecciones mixtas, siendo las combinaciones más frecuentes VPH18/16 con 31,25% (30/96) y VPH 18/6y11 con un 20,83% (20/96), esta última con significancia estadística ($p < 0,000029$ test χ^2). Sin embargo; al considerar cada genotipo por separado tanto el VPH18 como el VPH16 mostraron frecuencias mayores para infecciones individuales, 58,54 % (48/82) y 37,80% (31,82) respectivamente (Tabla 3).

Relación entre infección por VPH y resultado citológico de muestras cervicales

De 153 muestras positivas para infección con VPH, el 83,67% (128/153) mostró resultados citológicos normales, mientras que un 13,74% (21/153) fue reportado LIEBG, otras categorías como LIEAG y ASCUS-H fueron reportados en porcentajes muy bajos de 0,65% para cada uno. Al relacionar el reporte citológico LIEBG con infección por VPH18 se encontró una asociación con significancia estadística ($p < 0,02$ test χ^2) (Gráfico 2).

Relación entre infección por VPH y resultado colposcópico de muestras cervicales

De 153 muestras positivas para infección con VPH, el 49,67% (76/153) mostró resultados colposcópicos anormales, y un 47,71% (73/153) colposcopia normal. Dentro de los resultados anormales el 96,05% correspondieron a atipias colposcópicas menores y un 26,32% a atipias colposcópicas mayores. Se observó asociación estadísticamente significativa entre infección por VPH y colposcopia anormal, particularmente con reportes DZT (dentro de la zona de transformación) y ZINCN (zona iodo negativa de contornos netos) ($p < 0,0019$ test χ^2). De igual forma para epitelio acetoblanco denso y tenue ($p < 0,0019$ test χ^2). La asociación entre infección por VPH y test de Schiller positivo resultó estadísticamente positiva ($p < 0,02$ test χ^2) (Gráfico 3 y Gráfico 4).

Persistencia de la detección de infección por VPH y sus genotipos en muestras cervicales de 57 pacientes sometidas a estudio de seguimiento

Al hacer seguimiento a una cohorte de 57 mujeres del muestreo inicial, en un periodo de tiempo de 15 meses, se observó una prevalencia inicial de morbilidad del 49,12% (28/57 mujeres), a partir de esta condición se encontró en el segundo momento de su estudio, elevada negativización de la infección, demostrada por la ausencia de detección de ADN de

VPH en las muestras cervicales del 89,29% (25/28) de las mujeres inicialmente infectadas por VPH; igualmente, se halló baja persistencia de infección por VPH, 10,71% (3/28 mujeres), y al estudiar la persistencia de genotipos específicos, se encontró en sólo 1 caso para VPH18, representando el 16,67% (1/6) de las pacientes que fueron positivas inicialmente para este genotipo viral. Estas observaciones permiten establecer una incidencia acumulada de la infección por VPH del 10,34% (3/29) en 15 meses. Al determinar la tasa o densidad de incidencia de la infección viral, se obtuvo un valor de 4,23% (3/71), lo que es igual a 4,23 casos nuevos de infección por VPH por cada 100 personas, por año de seguimiento (Tabla 4).

Persistencia de la detección de infección por VPH en muestras cervicales de 57 pacientes sometidas a estudio de seguimiento y su relación con el reporte citológico

En el muestreo inicial, el 17,54% (10/57) de las mujeres evaluadas presentaron alteraciones citológicas, y el 80% (8/10) de las mismas fue positivo para la detección de ADN de VPH. Al observar los resultados obtenidos después del seguimiento, se puede apreciar que hubo una regresión del 100% (10/10) de las lesiones previamente diagnosticadas en todas las pacientes, tanto positivas como negativas para VPH, y negativización de la infección por VPH. Dos pacientes presentaron lesiones cervicales nuevas (LIE BG en ambas) después del tiempo de seguimiento; cabe resaltar que estas dos pacientes presentaron infecciones nuevas por VPH, clasificadas en el grupo de las que resultaron negativas para los genotipos virales investigados en el presente estudio (Tabla 5).

Persistencia de la detección de infección por VPH en muestras cervicales de 57 pacientes sometidas a estudio de seguimiento y su relación con el reporte colposcópico

El 50% (14/28) de las pacientes positivas para la infección por VPH en el muestreo inicial, mostraron lesiones colposcópicas, con escasa diferencia entre los casos de atipias menores y mayores. En el 85,71% (12/14) de dichos casos, se observó después del tiempo de seguimiento la desaparición de las alteraciones colposcópicas inicialmente encontradas, así como negativización de la infección por VPH (Tabla 6).

Discusión:

El porcentaje de detección de la infección viral fue de 37,40%, destacando que el 83,67% de estos reportes VPH positivos se presentaron en mujeres con citología normal, hallazgo que es considerado superior al registrado en la población general alrededor del mundo, comprendido entre 9 y 13% (3, 9, 21); así mismo, el porcentaje de infecciones por VPH determinado contrasta con la estimación descrita previamente por Bruni *et al.* (22) para América Latina, quienes describen una prevalencia de VPH del 16,10%, en mujeres con citologías normales.

El elevado porcentaje de muestras cervicales VPH positivas encontradas en nuestro estudio puede deberse a la naturaleza de estas infecciones, las cuales han mostrado elevada variabilidad, dependiendo de múltiples factores, tales como la demografía, las características de comportamiento de la población estudiada y el método de diagnóstico aplicado (23). Similarmente, estudios realizados al respecto en Venezuela, expresan un

rango de positividad variable para esta infección (5, 24-27); en este sentido, al contrastar los hallazgos del presente estudio con otras dos investigaciones realizadas en la población femenina del estado Mérida, utilizando para ello protocolos de diagnóstico diferentes al del presente estudio (VPH PCR-E6/E7); en uno se aplicó la prueba de Captura de Híbridos de segunda generación (28), mientras que en el otro se utilizó la técnica de amplificación de secuencias génicas específicas PCR-RFLP (29), en dichos estudios reportaron prevalencias para VPH del 12,54% y 51,90%, respectivamente; además, tanto en nuestro trabajo, como en el primero de los anteriormente citados, se evaluaron mujeres con y sin diagnóstico previo de infección por VPH, mientras que en el segundo sólo se estudiaron mujeres con diagnóstico clínico previo de la infección viral, ya sea por citología, colposcopia o biopsia. Estos datos sugieren que el método de diagnóstico utilizado y las características de la población evaluada, tienen una influencia directa en el nivel de detección de la infección viral.

Es importante enfatizar la elevada frecuencia de genotipos de VPHAR identificados en la población estudiada en la presente investigación, tanto en infecciones múltiples como individuales; así mismo, destaca en los hallazgos que VPH18 fue el genotipo viral más frecuentemente detectado, seguido por VPH16. La distribución relativa de estos genotipos en las mujeres evaluadas es similar a los datos publicados previamente en la ciudad de Mérida, Venezuela, los cuales evidencian predominio de infecciones por VPH18 sobre los otros genotipos evaluados (28). Por el contrario, los resultados del presente estudio difieren de los informes publicados anteriormente por otros investigadores alrededor del mundo, donde resalta que VPH16 fue el genotipo más identificado (30-33); sugiriendo que los genotipos de VPH reportados en diferentes regiones alrededor el mundo puede variar en tipo e incidencia relativa (33).

Entre las muestras positivas para ADN de VPH identificadas en este estudio, las infecciones múltiples con dos o más genotipos fueron reportadas en un 53,93%, mostrando la importancia de las pruebas de genotipificación en pacientes con un reporte positivo para la detección viral. Esta relevancia está signada fundamentalmente por el hecho de que las infecciones múltiples por diferentes genotipos de VPH incrementan la probabilidad de adquirir un genotipo de alto riesgo (23). Así mismo, estas co-infecciones tienen un elevado nivel de ocurrencia, lo cual sugiere la presencia de una acción sinérgica entre los diferentes genotipos virales diagnosticados en una sola muestra (34). En otras investigaciones realizadas al respecto, se sostiene que las implicaciones clínico-epidemiológicas de la infección con múltiples genotipos de VPH son inciertas. Esta afirmación está basada en estudios de seguimiento realizados en mujeres con infecciones por VPH múltiples, en las cuales se ha observado que, aunque los genotipos identificados tienden a formar grupos, el monitoreo de la infección en estas mujeres no muestra que estos grupos tengan una influencia determinante en el curso de la infección viral y el desarrollo de lesiones malignas en las pacientes afectadas (35).

Los resultados obtenidos en el presente estudio, a partir del análisis citológico de las muestras cervicales, por la técnica de Papanicolaou, evidencian que un 15,03% de las pacientes VPH positivas, mostraron cambios citológicos sugestivos de esta infección viral, resaltando el predominio de infecciones por VPH AR en las pacientes con diagnóstico de LIEBG. Los datos anteriormente mostrados reflejan una relación entre los genotipos de

VPH identificados y el reporte citológico anormal. Consecuentemente, estos resultados fortalecen el concepto ampliamente conocido, sobre la importancia de la detección y genotipificación de VPH dentro de la consulta ginecológica de rutina. En este orden de ideas, publicaciones previas han mostrado un elevado riesgo de progresión de las lesiones cervicales, de NIC I a CC, en pacientes infectadas con VPH16 y/o VPH18; estimándose que en un lapso de tiempo de 12 meses, en aproximadamente de 3,50% a 12% de las mujeres infectadas con genotipos de VPHAR, ocurre la progresión de lesiones cervicales a distintos grados de NIC (12, 34). Similarmente, dos meta análisis de publicaciones relacionadas con la prevalencia a nivel mundial de infección por VPH y la distribución de los genotipos virales en muestras cervicales, en mujeres con hallazgos citológicos normales y anormales, concluyeron que la realización de pruebas para el diagnóstico de VPH, simultáneamente con la evaluación citológica, estuvo asociada con una reducción significativa de la progresión de lesiones cervicales a CC y de las muertes por esta patología (22, 36).

Por otra parte, actualmente está bien reconocido que en alrededor del 60% de las mujeres con citología normal y una prueba de ADN de VPH positiva, el reporte de la infección viral se negativiza en los seis meses siguientes al primer informe. Sin embargo, cuando se trata de pacientes mayores de 40 años, el riesgo de progresión de NIC I a NIC III en los 10 años siguientes aumenta significativamente, comparado con el de las mujeres jóvenes (12, 37). La variación de distribución de la infección por VPH en pacientes con LIE y CC, así como la información sustentada en estudios prospectivos, establecen que existe un riesgo genotipo-específico del desarrollo y evolución de lesiones cervicales, en las mujeres con citología anormal; sugiriendo que, en la práctica clínica, la distinción del genotipo de VPH involucrado en el proceso infeccioso tiene el potencial de mejorar el monitoreo de las mujeres con LIE (22). En otras palabras, la identificación de VPH ha mostrado mayor sensibilidad para sugerir la presencia de lesiones neoplásicas, comparado con el test de Papanicolaou (38).

Cabe resaltar las recomendaciones para pruebas de tamizado de CC, emitidas en el Congreso Americano de Ginecólogos y Obstetras 2012, las cuales señalan que las evaluaciones ginecológicas con citología cervical no deben ser superiores a un 1 año; sin embargo, el tiempo entre evaluaciones puede aumentar a un intervalo entre 3 a 5 años con realización de citología y la incorporación de pruebas de detección de la infección por VPHAR (39). Esta sugerencia de despistaje está dirigida a disminuir las tasas de CC que se registran anualmente en el mundo, principalmente en los países en vías de desarrollo, ya que la citología convencional tiene limitaciones al comparar su sensibilidad y especificidad con la colposcopia o los análisis histopatológicos de biopsias (37).

El examen colposcópico realizado fue sugestivo de la infección viral en un rango superior al obtenido por la técnica de Papanicolaou, igualmente, se observó una asociación estadística significativa entre la detección de VPH y los hallazgos colposcópicos anormales, demostrándose que la colposcopia tuvo un elevado valor predictivo para el diagnóstico de la infección por VPH. Estos resultados son coincidentes con los reportados por Mitchell y col. (40), quienes encontraron una sensibilidad y especificidad promedio de 96% y 48%, respectivamente, de la colposcopia para la detección de anomalías histopatológicas, incluyendo NIC I a NIC III y CC. Los hallazgos del presente estudio ratifican la

importancia de la evaluación colposcópica realizada a las pacientes durante el examen ginecológico de rutina; en este sentido, se ha demostrado que en aproximadamente el 69% de las mujeres que presentan cambios colposcópicos atípicos se identifica al menos un genotipo de VPHAR (41).

En el presente estudio, a 57 participantes se les realizó un seguimiento durante el periodo de tiempo de 15 meses, siendo la tasa de morbilidad de la infección por VPH en este grupo del 49,12%. Al finalizar el tiempo de seguimiento se pudo apreciar que la persistencia de casos positivos para la infección por VPH fue baja (10,71%); así mismo, la infección persistente por genotipos específicos virales sólo se identificó en una paciente positiva para VPH18 (16,67%). Los datos obtenidos en el presente estudio coinciden con lo planteado en otra investigación, en la que se demostró que la infección por genotipos de VPH oncogénicos tiene un promedio de duración aproximada de 8 meses, mientras que la duración por VPH no oncogénicos se estima en 4 meses (42). Numerosos estudios han señalado que la infección persistente por VPH es de suma importancia en el desarrollo y avance de lesiones precancerosas a CC, y que este proceso puede tomar de 1-10 años (13). Así mismo, es conocido que la asociación entre la infección por VPHAR y la presencia de NIC es más fuerte para una persistencia de 12 meses, que para una de 6 meses, aunque esta relación puede variar dependiendo del genotipo viral (43). Algunos datos sugieren que VPH16 persiste en promedio más tiempo infectando el epitelio cervical, en comparación con otros genotipos virales, de tal manera que aquellas lesiones asociadas a la presencia de VPH16 podrían progresar a un cáncer más rápidamente que las que no presentan VPH o tienen otro tipo viral (44).

Datos complementarios a los obtenidos en la presente investigación con respecto a la persistencia de la infección por VPH, muestran que se determinó un elevado porcentaje general de negativización de la infección viral (89,29%) en las 28 pacientes VPH positivas en el muestreo inicial. En este sentido, existe consistencia entre nuestros resultados y las estimaciones de diversos estudios realizados en mujeres VPH positivas, en las que la tasa de resolución de la enfermedad viral es alta a lo largo del primer año de infección, tal como lo describen los trabajos realizados por Schmeink y col. (45), y Muñoz y col. (46), quienes reportaron una resolución de la infección viral del 70% antes de los 6 meses del intervalo de seguimiento, y una media de duración de la infección por VPHAR de 14,8 meses, respectivamente.

La incidencia acumulada de la infección por VPH, obtenida en esta investigación (10,34%, en 15 meses) difiere de otros estudios publicados previamente, en los cuales este indicador es considerablemente superior, Winer y col. (34) citan una incidencia acumulada del 32,3% (IC 95% = 28,0-37,1) a los 2 años de seguimiento, en 603 universitarias; esta diferencia podría deberse a que el trabajo referido incluyó mayor número de participantes y sólo mujeres jóvenes, mientras que en la presente investigación el número de mujeres estudiadas fue menor, se incorporaron tanto jóvenes como mujeres mayores, con un rango de edad entre 15 y 69. Muñoz y col. (47) reportaron una elevada incidencia de infecciones por VPH en su investigación de seguimiento desarrollada en 1.728 mujeres, durante 9 años; en este caso, aunque la población estudiada incluyó tanto jóvenes como mujeres de edad madura (rango entre 15-85 años) las diferencias con nuestro estudio estarían definidas por el número de participantes y el tiempo de seguimiento.

En cuanto a la tasa o densidad de incidencia de la infección viral, se obtuvo un valor de 4,23 casos nuevos de infección por VPH por cada 100 personas, por año de seguimiento; Estos resultados coinciden con los reportados en otro estudio de cohorte realizado en Colombia, que incluyó 1.610 mujeres entre 15 y 85, años con citología normal, a las que se les realizó seguimiento cada 6 meses durante una media de 4,1 años, y la tasa de incidencia determinada para VPHAR fue de 5 casos por 100 mujeres-año (46). Así mismo, Font y col. (48), en 1.383 mujeres atendidas en el área metropolitana de Barcelona, España, observaron una incidencia de nuevas infecciones del 2,00% anual a lo largo de un seguimiento de 3 años. La distribución de las infecciones por VPH identificadas en las 57 pacientes a las cuales se les aplicó el protocolo de seguimiento, de acuerdo a los resultados de las evaluaciones citológicas realizadas, evidenció que en el muestreo inicial, el 17,54% de las participantes presentó alteraciones citológicas; después del seguimiento, hubo una regresión del 100% de dichas lesiones, tanto en mujeres positivas como negativas para VPH, dicha regresión fue simultánea con la negativización de la infección viral, lo cual apoya la relación causal entre la infección por VPHAR y la ocurrencia de lesiones cervicales en las mujeres afectadas.

La evaluación de las infecciones persistentes por VPH, diagnosticadas en esta investigación, de acuerdo con las atipias colposcópicas reportadas, mostró que las tres pacientes bajo esta condición no presentaron atipias colposcópicas después del seguimiento. Por otra parte, hubo regresión de las alteraciones colposcópicas en un elevado porcentaje de las pacientes que presentaron negativización de la infección viral. Los resultados presentados anteriormente sustentan el concepto según el cual la severidad de las alteraciones colposcópicas estaría relacionada con la frecuencia de infecciones cervicales persistentes por VPHAR (49, 50), hecho sustentado en que la mayoría de los CC son precedidos por largos periodos de infecciones por VPHAR, y la presencia de estos genotipos virales en las células afectadas conlleva a múltiples cambios en el tejido intraepitelial cervical, lo cual aumenta la posibilidad de su desarrollo progresivo a NIC III y a CC (49). En relación a la edad, al considerar la positividad de infección por VPH, el 85% se ubicó en mujeres menores de 45 años de edad, con los máximos porcentajes de positividad en el grupo de menores de 35 años de edad. Diferentes estudios realizados en Venezuela reportan resultados que coinciden con los obtenidos en el presente estudio (5, 28, 51). La positividad de la infección por VPH declinó con el aumento de la edad de las participantes; este dato coincide con los hallazgos obtenidos en un trabajo llevado a cabo recientemente en Italia, en el cual la prevalencia de genotipos de VPHAR tuvo un incremento significativo en las mujeres menores de 35 años, para luego disminuir gradualmente con el aumento de la edad de las participantes (52). La disminución de prevalencia de la infección por VPH a medida que aumenta la edad, a menudo está definida por cambios en el comportamiento sexual, y a eliminación del proceso infeccioso mediado por la acción localizada de los elementos del sistema inmunológico de la persona afectada (53).

Conclusiones

El presente trabajo muestra una elevada frecuencia de infección por VPHAR en la población de mujeres menores de 45 años de edad evaluadas en este estudio, con predominio de VPH18 y 16 y en general de infecciones múltiples. La colposcopia resultó mejor predictor que la citología para infección por VPH con significancia estadística entre la infección por este virus y colposcopia anormal. El estudio de seguimiento de la cohorte permitió observar un bajo porcentaje de infección persistente, una elevada frecuencia de negativización de la infección viral, elevado porcentaje de regresión de lesiones citológicas y colposcópicas, una incidencia acumulada baja y una tasa de incidencia similar a la reportada por otros países latinoamericanos y superior a países europeos.

Conflictos de Interés

Declaro que no existe conflicto de intereses entre los autores del presente artículo original de investigación

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por los proyectos macro del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) -G-2005000408 y Misión Ciencia LUZPROLAB N° 2007001088.

Los autores agradecen a la Dra. Melisse Milano, Dra. Asmiria Sotolongo y Dra. Pierina Petrossino, del Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela. Los autores expresan su agradecimiento a los especialistas en ginecología y obstetricia del Departamento de Ginecología, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Bibliografía

1. zur Hausen H (2009) **Papillomaviruses in the causation of human cancers-a brief historical account** *Virology* **384** 260-265
2. Burk R, Chen Z y Van Doorslaer K (2009) **Human Papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity** *Public Health Genom* **12** 281-290.
3. Castellsagué X (2008) **Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer** *Gynecol Oncol* **110** S4-S7
4. GLOBOCAN (2012) **International Agency for Research on Cancer. 2013** <http://globocan.iarc.fr/>. Acceso 3 de Octubre de 2014.
5. Reigosa A, Alvarez M, De Vasconcelo M, Cristina R, Salas W, Rebolledo V, Voldman A (2004) **Diagnóstico del virus papiloma humano en cuello uterino de mujeres que acuden a su consulta anual citológica** *Salus* **8(1)** 26-31
6. Correnti M, Cavazza M, Herrera O, Rodríguez A (2010) **Presence of human Papillomavirus infection determined by hybrid capture assay in cervical lesions in a Venezuelan population** *Invest Clin* **51** 27-35
7. Contreras L, Correnti M, Ávila M, Guerrero A, León A (2008) **Virus Papiloma Humano (VPH) en contexto ecológico venezolano. (I): diagnóstico citológico y molecular** *Salus* **12(3)** 68-77
8. Ministerio del Poder Popular para la Salud (2013) **MPPS avanza en los métodos de detección temprana del Cáncer de Cuello Uterino** *MPPS* <http://www.mpps.gov.ve> Acceso 12 de Noviembre de 2014

9. World Health Organization/Institut Català d'Oncologia, Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre) (2010) **Papillomavirus and related cancers in Venezuela Summary Report Venezuela WHO/ICO** <http://www.who.int/hpvcentre> Acceso 12 de Noviembre de 2014
10. Longworth MS, Laimins LA (2004) **Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia** *Microbiol Mol Biol Rev* **68(2)**362-72
11. Yuan ChH, Filippova M, Duerksen-Hughes P (2012) **Modulation of apoptotic pathways by human papillomaviruses (HPV): mechanisms and implications for therapy** *Viruses* **4** 3831-50
12. Insinga R, Dasbach E, Elbasha E, Liaw K, Barr E (2007) **Progression and regression of incident cervical HPV 6, 11, 16 and 18 infections in young women** *Infect Agent Cancer* **2** 15
13. Gravitt, P (2011) **The known unknowns of HPV natural history** *J Clin Invest* **121** 4593-4599
14. Idänpään-Heikkilä J (2001) **Ethical principles for the guidance of physicians in medical research-the Declaration of Helsinki** *Bull WHO* **79(4)** 279.
15. National Cancer Institute (2008) **Bethesda 2001: A revised system for reporting Pap Test results aims to improve cervical cancer screening** *NCI* <http://www.bethesda2001.cancer.gov> Acceso 2 de Noviembre de 2014.
16. Walker P, Dexeus S, De Palo G, Barrasso R, Campion M, Girardi F, y col (2003) **International terminology of colposcopy: an updated report from the IFCPC** *Obstet Gynec* **101** 175-7.
17. Cortiñas P, Centeno I, Sánchez J, Martín D (2009) **Reunión de consenso en virus de papiloma humano 2008** *Gac Méd Caracas* **117** 49-69.
18. Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, y col (2004) **Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR** *J Clin Microbiol* **42(7)** 3176-84
19. Saiki R, Bugawan T, Horn G, Mullis K, Erlich H (1986) **Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes** *Nature* **324** 163-6.
20. Pita Fernández S, Pértegas Díaz S, Valdés Cañedo F (2004) **Medidas de frecuencia de enfermedad** *Cad Aten Primaria* [http:// www.fisterra.com](http://www.fisterra.com) Acceso 17 de agosto de 2013
21. Organización Panamericana De La Salud/Organización Mundial De La Salud (2008) **48° Consejo Directivo. 60ª Sesión Del Comité Regional** Washington, D.C, EUA
22. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch F, de Sanjosé S (2010) **Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings** *J Infect Dis* **202** 1789-99
23. Trottier H, Burchell A (2009) **Epidemiology of mucosal human Papillomavirus infection and associated diseases** *Pub Health Genom* **12** 291-307
24. Alfonzo B, Lozada E, Correnti M, Cavazza M, Michelli P, Salma N (2003) **Detección del virus papiloma humano en muestras cervicales de una población de estudiantes de la Universidad Central de Venezuela** *Rev Fac Med* **26** 120- 6
25. De Guglielmo Z, Ávila M, Veitía D, Cavazza M (2008) **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* **68** 240-7
26. Suárez C, Mijares A, Castillo L, Briceño J (2006) **Tipificación del VPH en cáncer de cuello uterino en la población venezolana** *Rev Venez Oncol* **18(4)** 221-5

27. Salazar E (2007) **Detección del virus de papiloma humano en pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas de cuello uterino** *Rev Obstet Ginecol Venez* **67** 47-54
28. Muñoz M, Mendoza JA, Téllez L, Noguera M, Moret O, López M, y col (2003) **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* **14** 61-8.
29. Quintero M, Cruz J, Bastidas M, Márquez L, Puig J (2008) **Detección y tipificación de virus del papiloma humano (VPH) mediante PCR-RFLP** *Rev Obstet Ginecol Venez* **68** 25-31
30. Haghshenas M, Golini-Moghaddam T, Rafiee A, Emadeian O, Shykhpour A, Ashrafi G H (2013) **Prevalence and type distribution of high-risk human papillomavirus in patients with cervical cancer: a population-based study** *Infect Agents and Cancer* <http://dx.doi:10.1186/1750-9378-8-20> Acceso 20 de Agosto del 2013 **8** (1) 20
31. Vaccarella S, Herrero R, Dai M, Snijders P, Meijer C, Thomas J, y col (2006) **Reproductive factors, oral contraceptive use, and human papillomavirus infection: pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15** 2148-53
32. Clifford G, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders P, Vaccarella S, y col (2005) **Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis** *Lancet* **366** 991-8
33. Conesa-Zamora P, Ortiz-Reina S, Moya-Biosca J, Doménech-Peris A, Orantes-Casado F, Pérez-Guillermo M, y col (2009) **Genotype distribution of human papillomavirus (HPV) and co-infections in cervical cytologic specimens from two outpatient gynecological clinics in a region of southeast Spain** *BMC Infect Dis* **9**(124) <http://dx.doi:10.1186/1471-2334-9-124> Acceso 17 Noviembre 2014
34. Winer R, Kiviat N, Hughes J, Adam D, Lee S-K, Kuypers J, y col (2005) **Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection** *J Infect Dis* **191** 731-8
35. Vaccarella S, Franceschi S, Snijders P, Herrero R, Meijer C, Plummer M y col (2010) **Concurrent infection with multiple human papillomavirus types: pooled analysis of the IARC HPV Prevalence Surveys** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **19**(2) 503-10
36. Bhatla N, Moda N (2009) **The clinical utility of HPV DNA testing in cervical cancer screening strategies** *Indian J Med Res* **130** 261-5
37. Peralta-Zaragoza O, Deas J, Gómez-Cerón C, García-Suastegui WA, Fierros- Zárate GS, Jacobo-Herrera NJ (2013) **HPV-based screening, triage, treatment, and followup strategies in the management of cervical intraepithelial neoplasia** *Obst Gynecol Internat* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/912780> Acceso 12 de septiembre de 2013
38. Mayrand M-H, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter S, Hanley J, Ferenczy A y col (2007) **Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer** *N Engl J Med* **357** 1579-88
39. American Congress of Obstetricians and Gynecologists, Cervical Cancer Screening Recommendations (2012) **New Cervical Cancer Screening Recommendations from the U.S. Preventive Services Task Force and the American Cancer Society/American Society for Colposcopy and Cervical Pathology/American Society for Clinical**

Pathology 2012 <http://www.acog.org/aboutACOG/Announcements/New> Acceso 12 de septiembre de 2013

40. Mitchell M, Schottenfeld D, Tortolero-Luna G, Cantor S, Richards-Kortum R (1998) **Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis** *Obstet Gynecol* **91** 626-31

41. Jarienė K, Vaitkienė D, Bartusevičius A, TvariJonavičienė E, Minkauskienė M, Nadišauskienė R y col (2012) **Prevalence of human papillomavirus types 16, 18, and 45 in women with cervical intraepithelial changes: associations with colposcopic and histological findings** *Medicina (Kaunas)* **48**(1) 22-30

42. Schiffman M, Kjaer KS (2003) **Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia** *JNCI Monographs* **31** 14-9

43. Koshiol J, Lindsay L, Pimenta JM, Poole C, Jenkins D, Smith JS (2008) **Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis** *Am J Epidemiol* **168** 123-37

44. Lizano-Soberón M, Carrillo-García A, Contreras-Paredes A (2009) **Infección por virus del papiloma humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis** *Cancerología* **4** 205-16

45. Schmeink CE, Melchers WJG, Siebers AG, Quint WGV, Massuger LFAG, Bekkers RLM (2011) **Human papillomavirus persistence in young un-screened women, a prospective cohort study** *PloS ONE* **6**(11) <http://e27937.doi:10.1371/journal.pone.0027937> Acceso 12 de septiembre de 2013

46. Muñoz N, Méndez F, Posso H, Molano M, Van den Brule A, Ronderos M y col (2004) **Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results** *J Infect Dis* **190** 2077-87

47. Muñoz N, Hernandez-Suarez G, Méndez F, Molano M, Posso H, Moreno V y col (2009) **Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women** *Br J Cancer* **100** 1184-90

48. Font R, Pérez M, Coll C, AVECILLA A, Vilamala M, Martínez F y col (2004) **Utilización de modelos longitudinales para estimar el tiempo de regresión/progresión de la infección por el virus del papiloma humano en una cohorte de mujeres atendidas en centros de planificación familiar en Barcelona, España** *Gac Sanit* **18**(Supl 3) 11-148

49. Jovanović AM, Dikić SD, Jovanović V, Zamurović M, Nikolić B, Krsić V y col (2012) **Correlation of human papilloma virus infection with cytology, colposcopy and histopathological examination of the bioptic tissue in low- and high-grade intraepithelial lesions** *Eur J Gynaecol Oncol* **33**(5) 512-6

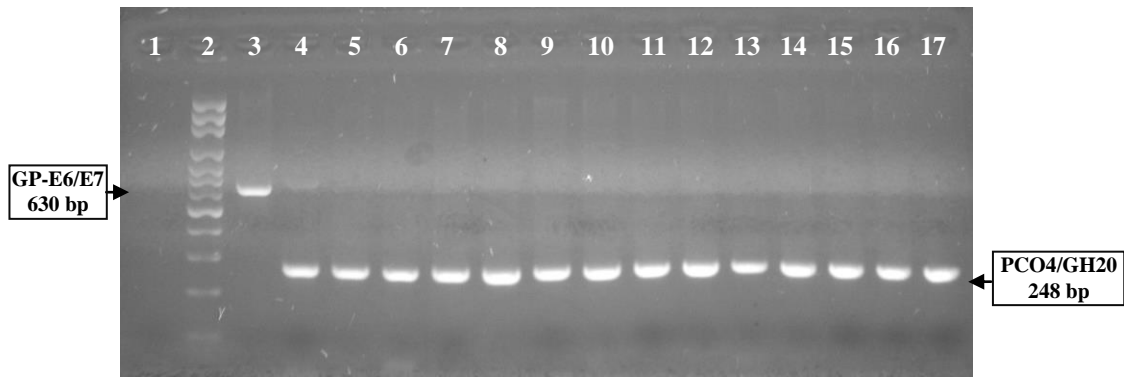
50. Le Donne M, Giuffrè G, Caruso C, Nicotina PA, Alibrandi A, Scalisi R y col (2013) **Human papillomavirus types distribution in eastern sicilian females with cervical lesions. A correlation with colposcopic and histological findings** *Pathol Oncol Res* **19**(3) 481-7

51. Núñez-Troconis J, Delgado M, González J, Mindiola R, Velásquez J, Conde B y col (2009) **Prevalence and risk factors of human papillomavirus infection in asymptomatic women in a Venezuelan urban area** *Invest Clin* **50**(2) 203-12

52. Baussano I, Franceschi S, Gillio-Tos A, Carozzi F, Confortini M, Dalla P y col (2013) **Difference in overall and age-specific prevalence of high-risk human papillomavirus infection in Italy: evidence from NTCC trial** *BMC Infect Dis* **13**(1) 238

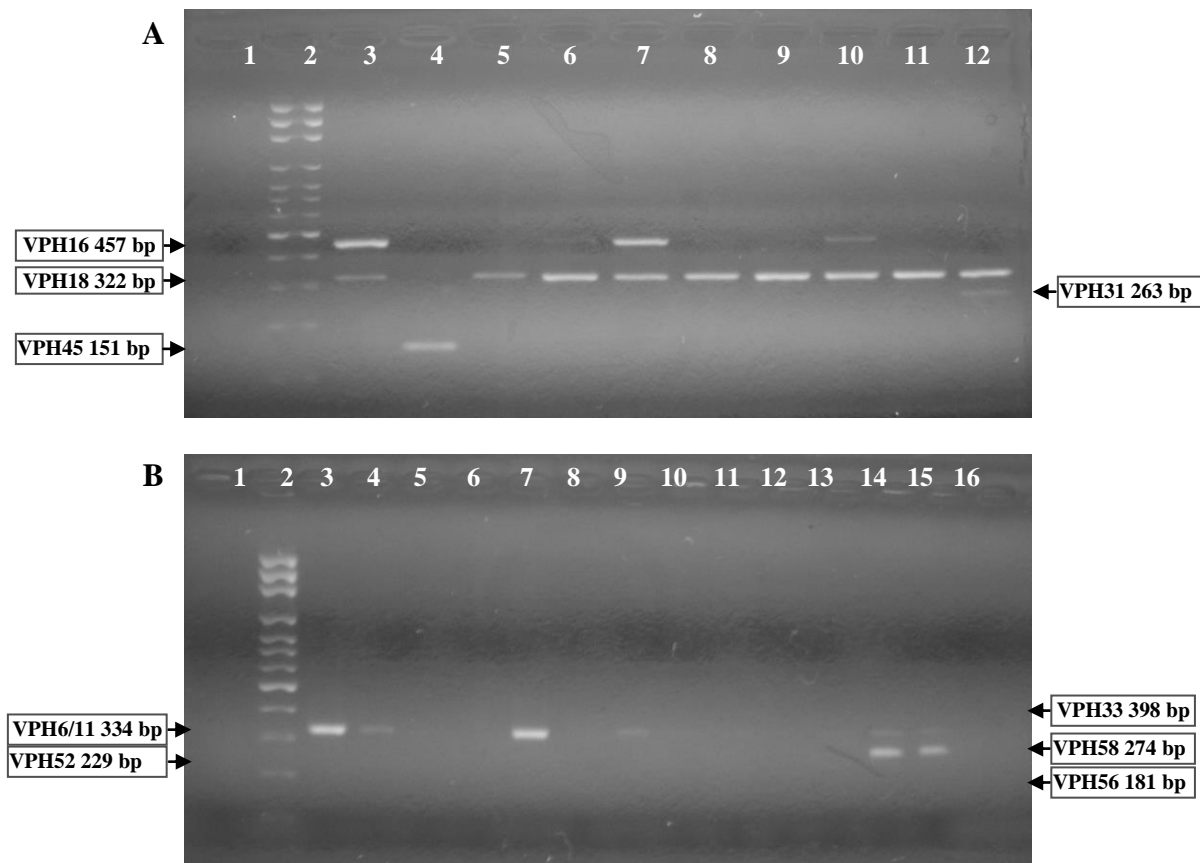
53. Stanley M, Lowy D, Frazer I (2006) **Prophylactic HPV vaccines: Underlying mechanisms** *Vaccine* **24(Suppl 3)** S3/106-13

Figura 1. Reacción en cadena de la polimerasa para amplificación de VPH, región génica *e6e7*.



PCR VPH E6/E7: 1: Control negativo; 2: Marcador Peso Molecular; 3: Control positivo genérico HPV-C001, amplicon de 630 pb; 4: Muestra VPH positiva; 5-17: Muestras VPH negativas. En todas las muestras (4-17) se observa amplificación de un fragmento específico del gen de la beta-globina humana.

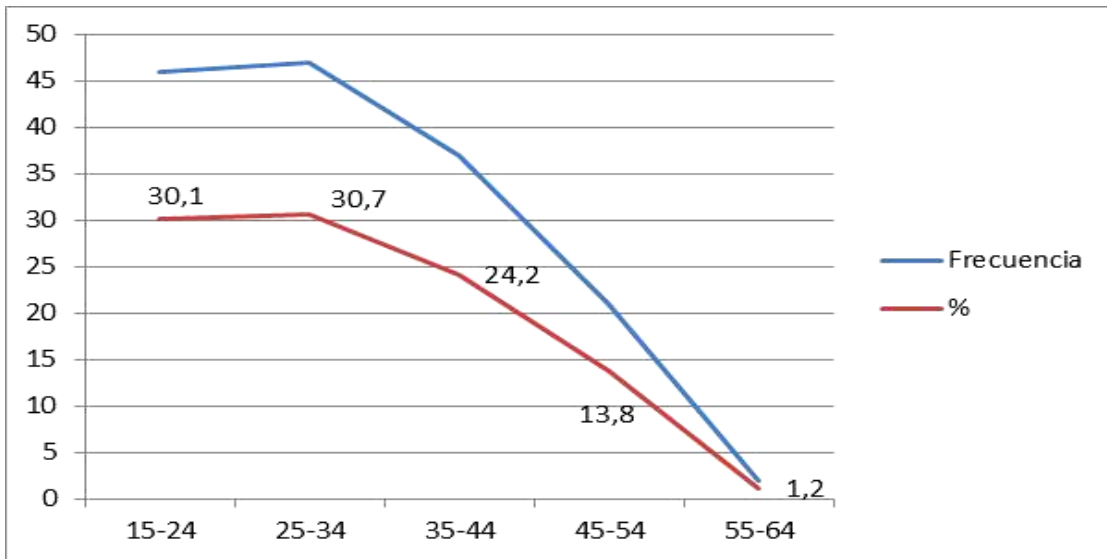
Figura 2. Reacción en cadena de la polimerasa Nested-Múltiple para amplificación de genotipos específicos de VPH, región génica *e6e7*.



Nested PCR Múltiple, VPH E6/E7. A. Identificación de los genotipos VPH16, 18, 31 y 45. 1: Control negativo; 2: Marcador Peso Molecular; 3: Control positivo genérico HPV-

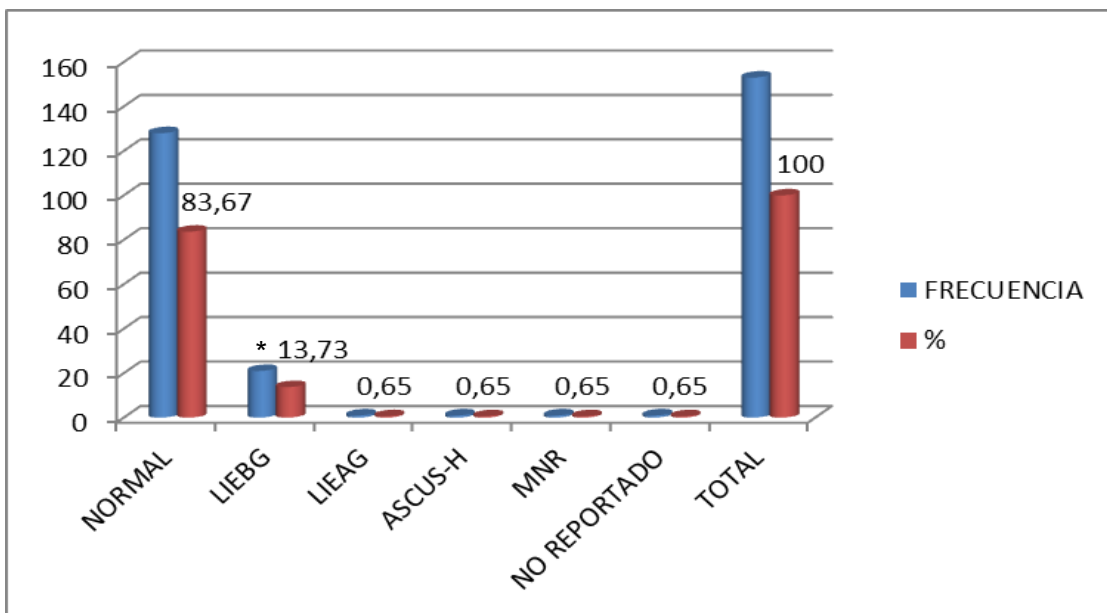
C001, amplicon de 457 pb; Control positivo para VPH18 (HPV-4011-18), amplicon de 322 pb; **4:** Muestra positiva para VPH45; **5, 8, 9, 11:** Muestras positivas para VPH18; **6, 7, 10:** Muestras positivas para VPH16/18; **12:** Muestra positiva para VPH18/31. **B. Identificación de los genotipos VPH6/11, 33, 52, 56 y 58.** **1:** Control negativo; **2:** Marcador Peso Molecular; **3:** Control positivo para VPH11 (HPV-4009-11), amplicon de 334 pb; **4, 7, 9:** Muestras positiva para VPH6/11; **14, 15:** Muestras positivas para VPH6/11/58; **6, 8, 10-13, 16:** Muestras negativas.

Gráfico 1: Frecuencia de detección de VPH en muestras cervicales de pacientes femeninas por grupos de edad. Mérida- Venezuela. 2008-2012.



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

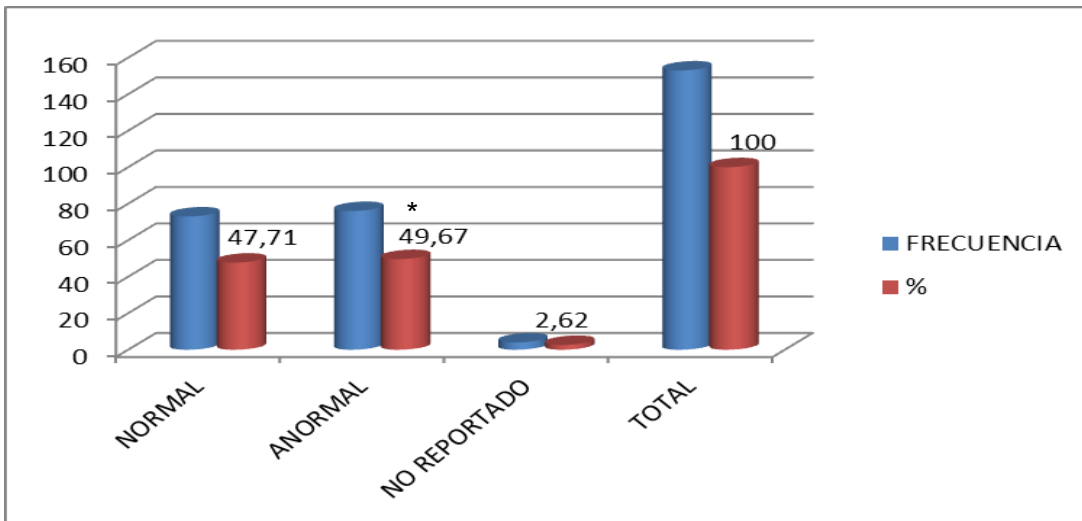
Gráfico 2: Relación entre infección por VPH y citología de muestras cervicales. Mérida- Venezuela. 2008-2012.



* LIEBG e infección por VPH18 ($p=0,02; \chi^2$)

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

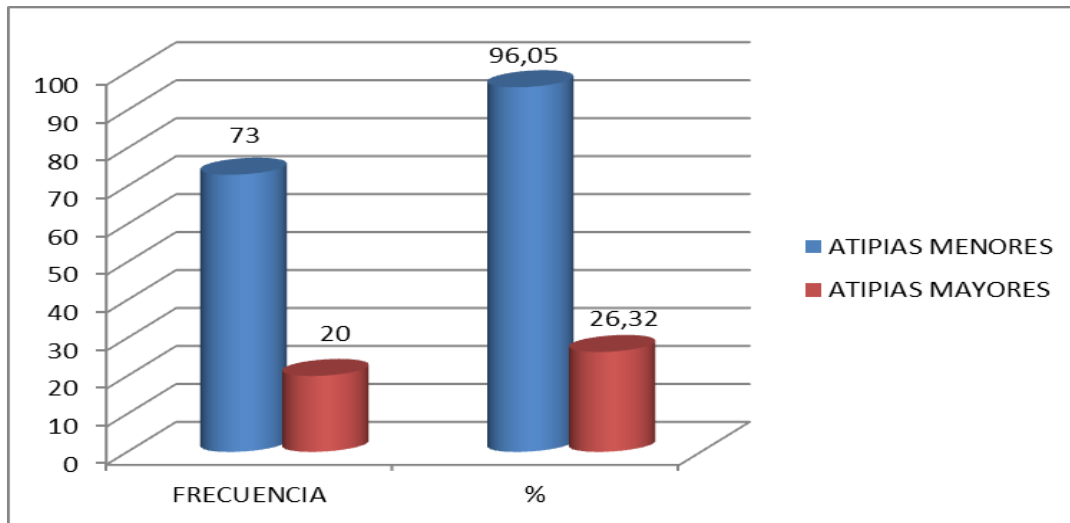
Gráfico 3: Relación entre infección por VPH y colposcopia de cuello uterino. Mérida- Venezuela. 2008-2012



* VPH y colposcopías anormales ($p=0,0019 \chi^2$)

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

Gráfico 4: Relación entre infección por VPH y colposcopia de cuello uterino. Mérida- Venezuela. 2008-2012



VPH y epitelio acetoblancos denso y tenue ($p<0,0019; \chi^2$)

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

**Tabla 1: Frecuencia de detección molecular de VPH en mujeres
Mérida- Venezuela. 2008-2012**

| VPH | Número | % | % acumulado |
|-------|--------|--------|-------------|
| SI | 153 | 37,40 | 37,40 |
| NO | 256 | 62,60 | 100,00 |
| TOTAL | 409 | 100,00 | 100,00 |

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

**Tabla 2: Frecuencia de genotipos de VPH en 153 muestras
cervicales Mérida- Venezuela. 2008-2012**

| VPH | Frecuencia | % | % acumulado |
|--------|------------|-------|----------------|
| 18 | 83 | 46,64 | 46,64 |
| 16 | 61 | 34,28 | 80,92 |
| 31 | 2 | 1,12 | 82,04 |
| 45 | 2 | 1,12 | 83,16 |
| 52 | 2 | 1,12 | 84,28 |
| 56 | 1 | 0,56 | 84,84 |
| 58 | 2 | 1,12 | 85,96 |
| 6 Y 11 | 25 | 14,04 | 100,00 |
| TOTAL | 178 | 100 | 100,00 |

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

Tabla 3: Frecuencia de infecciones únicas y mixtas por genotipos de VPH encontrados en 153 muestras cervicales Mérida- Venezuela 2008-2012.

| VPH | Únicas | % | Mixtas | % | Total |
|---------------|---------------|----------|---------------|----------|--------------|
| 18 | 48 | 58,54 | 35 | 36,47 | 83 |
| 16 | 31 | 37,80 | 30 | 31,25 | 61 |
| 31 | 0 | 0,00 | 2 | 2,08 | 2 |
| 45 | 0 | 0,00 | 2 | 2,08 | 2 |
| 52 | 1 | 1,22 | 1 | 1,04 | 2 |
| 56 | 1 | 1,22 | 0 | 0,00 | 1 |
| 58 | 1 | 1,22 | 1 | 1,04 | 2 |
| 6 Y 11 | 0 | 0,00 | 25 * | 26,04 | 25 |
| TOTAL | 82 | 100,00 | 96 | 100,00 | 178 |

* VPH 18/6y11 con un 20,83% (20/96) ($p < 0,000029$; test χ^2)

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

Tabla 4: Infección inicial por VPH, persistencia y negativización de infección en la cohorte de 57 pacientes estudiadas. Mérida-Venezuela 2008-2012.

| Genotipificación de VPH | Infección Inicial por Genotipos de VPH | | Persistencia de las infecciones por Genotipos de VPH a los 15 meses +/- 5 meses | | Negativización de infecciones por Genotipos de VPH a los 15 meses +/- 5 meses | |
|---------------------------------|---|----------|--|----------|--|----------|
| | n | % | n | % | n | % |
| Infecciones Individuales | | | | | | |
| VPH16 | 9 | 32,14 | - | - | 9 | 100,0 |
| VPH18 | 6 | 21,43 | 1 | 16,67 | 5 | 83,33 |
| Infecciones Múltiples | | | | | | |
| VPH16/18 | 4 | 14,29 | - | - | 4 | 100,0 |
| VPH18/6/11 | 2 | 7,14 | - | - | 2 | 100,0 |
| VPH18/58 | 1 | 3,57 | - | - | 1 | 100,0 |
| Otros genotipos de VPH | 6 | 21,43 | 2 | 33,33 | 4 | 66,67 |
| Total | 28 | 100,0 | 3 | 10,71 | 25 | 89,29 |

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

Tabla 5: Infección inicial por VPH, persistencia, negativización de infección y reporte citológico en la cohorte de 57 pacientes estudiadas a los 15 +/-5 meses Mérida-Venezuela 2008-2012.

| Estatus de la Infección por VPH inicial | | | | | | | | | | | | | |
|---|--------------|----|--------------|----|-------|---|----|--|---|---|---|-------|----|
| Hallazgos Citológicos | VPH Negativo | | VPH Positivo | | Total | Infecciones Individuales por genotipos de VPH | | Infecciones Múltiples por genotipos de VPH | | Infecciones por genotipos de VPH no identificados | | Total | |
| | n | % | n | % | | n | n | % | n | % | n | | % |
| Citología Positiva | ASCUS | 1 | 3,45 | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| | LIE BG | 1 | 3,45 | 6 | 21,43 | 7 | 4 | 26,67 | 1 | 14,29 | 1 | 16,67 | 6 |
| | LIE AG | - | - | 2 | 7,14 | 2 | 1 | 6,67 | - | - | 1 | 16,67 | 2 |
| Citología Negativa [‡] | | 27 | 93,10 | 20 | 71,43 | 47 | 10 | 66,67 | 6 | 85,71 | 4 | 66,67 | 20 |
| Total | | 29 | 100,0 | 28 | 100,0 | 57 | 15 | 100,0 | 7 | 100,0 | 6 | 100,0 | 28 |

| Estatus de la Infección por VPH después del seguimiento durante 15 +/- 5 meses | | | | | | | | | | | | | |
|--|--------------|----|--------------|----------------|-------|---|---|--|---|---|----|-------|---|
| Hallazgos Citológicos | VPH Negativo | | VPH Positivo | | Total | Infecciones Individuales por genotipos de VPH | | Infecciones Múltiples por genotipos de VPH | | Infecciones por genotipos de VPH no identificados | | Total | |
| | n | % | n | % | | n | n | % | n | % | n | | % |
| Citología Positiva | ASCUS | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | LIE BG | - | - | 2 [?] | 33,33 | 2 | - | - | - | - | 2 | 33,33 | 2 |
| | LIE AG | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Citología Negativa [‡] | | 51 | 100,0 | 4 | 66,67 | 55 | - | - | - | - | 4* | 66,67 | 4 |
| Total | | 51 | 100,0 | 6 | 100,0 | 57 | - | - | - | - | 6 | 100,0 | 6 |

[‡]: Negativo para Lesiones Intraepiteliales o Malignidad; **ASCUS**: Células Escamosas Atípicas de Significado Incierto; **LIE BG**: Lesión Intraepitelial de Bajo Grado; **LIE AG**: Lesión Intraepitelial de Alto Grado; -: Resultado negativo (0);
[?]: Nuevas Lesiones reportadas después del seguimiento; *: 3 infecciones persistentes por VPH.

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

Tabla 6: Infección inicial por VPH, persistencia, negativización de infección y colposcopia en la cohorte de 57 pacientes estudiadas a los 15 +/-5 meses Mérida-Venezuela 2008-2012.

| Hallazgos Colposcópicos | Estatus de la Infección por VPH inicial | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|---|----|--------------|----|-------|---|----|--|---|---|---|-------|----|
| | VPH Negativo | | VPH Positivo | | Total | Infecciones Individuales por genotipos de VPH | | Infecciones Múltiples por genotipos de VPH | | Infecciones por genotipos de VPH no identificados | | Total | |
| | n | % | n | % | | n | % | n | % | n | % | | n |
| Colposcopia Positiva | Atipias Menores | 8 | 27,57 | 8 | 28,57 | 16 | 4 | 26,67 | 2 | 28,57 | 2 | 33,33 | 8 |
| | Atipias Mayores | 2 | 6,70 | 6 | 21,43 | 8 | 3 | 20,00 | 1 | 14,29 | 2 | 33,33 | 6 |
| Colposcopia Negativa | | 19 | 65,52 | 14 | 50,00 | 33 | 8 | 53,33 | 4 | 57,14 | 2 | 33,33 | 14 |
| Total | | 29 | 100,0 | 28 | 100,0 | 57 | 15 | 100,0 | 7 | 100,0 | 6 | 100,0 | 28 |

| Hallazgos Colposcópicos | Estatus de la Infección por VPH después del seguimiento durante 15 +/- 5 meses | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|--|-----|--------------|-----|-------|---|---|--|---|---|---|-------|---|
| | VPH Negativo | | VPH Positivo | | Total | Infecciones Individuales por genotipos de VPH | | Infecciones Múltiples por genotipos de VPH | | Infecciones por genotipos de VPH no identificados | | Total | |
| | n | % | n | % | | n | % | n | % | n | % | | n |
| Colposcopia Positiva | Atipias Menores | 15* | 29,41 | 3** | 50,00 | 18 | - | - | - | - | 3 | 60,00 | 3 |
| | Atipias Mayores | 1** | 1,96 | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| Colposcopia Negativa | | 35 | 68,63 | 3* | 50,00 | 38 | - | - | 1 | 100,00 | 2 | 40,00 | 3 |
| Total | | 51 | 100,0 | 6 | 100,0 | 57 | - | - | 1 | - | 5 | 100,0 | 6 |

♦: 5 casos nuevos de atipia cervical después del seguimiento; **: 1 caso nuevo de atipia cervical después del seguimiento; *: 3 infecciones persistentes por VPH; -: Resultado negativo(0).

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