



IDENTIFICACION DE LOS TIPOS DEL *VIRUS DE PAPILOMA HUMANO* ASOCIADOS A LOS CONDILOMAS Y CARCINOMAS CERVICOUTERINOS DIAGNOSTICADOS EN EL COMPLEJO HOSPITALARIO ARNULFO ARIAS MADRID ENTRE LOS AÑOS 2001 Y 2003

Florido Rodríguez Moreno

Universidad de Panamá, Facultad de Medicina, Departamento de Histología y Neuroanatomía
e-mail: drflorido@yahoo.es

RESUMEN

Los *virus del papiloma humano* (VPH) están asociados con la génesis y progresión del carcinoma cervicouterino (Cacu). En nuestro país se desconoce cual o cuales de la gran gama de esta superfamilia de virus están asociados a las fases del desarrollo de este cáncer. La principal intención de éste estudio es el determinar los tipos de VPH presentes en los condilomas y Cacu en Panamá, entre los años 2001 y 2003. Estudiamos 87 casos diagnosticados en el Departamento de Patología del Complejo Hospitalario Arnulfo Arias Madrid, como condiloma o Cacu y 87 controles. La detección y tipificación del PVH se realizó mediante identificación genómica utilizando el Kit PVHfast, fabricado por Genómica. Se extrae el ADN de las muestras y controles, en parafina, y es amplificado por medio de la reacción en cadena la ADN polimerasa (PCR). Las muestras positivas por el virus del papiloma se tratan con enzimas de restricción para evidenciar el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, de sus siglas en inglés). El estudio detecto PVH de bajo y alto riesgo en 7 de las 9 provincias de Panamá. Los resultados se analizaron en una tabla tetracórica para establecer asociación o no del VPH con la génesis del Cacu.

PALABRAS CLAVES

Carcinoma cervicouterino, virus del papiloma humano, reacción en cadena polimerasa, Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción, Población infectada.

ABSTRACT

The *human papillomavirus* (VPH) are associated to the genesis and progression of uterine cervix carcinoma (Cacu). In our country it is not known which of the strains of this broad family are associated to the development of this cancer. The main purpose of this work is to determine the types of PVH present in the condylomas and Cacu in Panama, between the years 2001 and 2003. We study 87 cases diagnosed in the department of Pathology at the Arnulfo Arias Madrid Hospital, as condyloma or Cacu and 87 controls. Detection and typing of PVH was performed by genomic identification using the PVHfast kit, manufactured by Genomica. DNA extraction was done from sample and controls, in paraffin, and is amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR). *Papillomavirus* positive samples were treated with restriction enzymes to determine restriction fragment length polymorphism (RFLP). the study detects VPH of under and high risk in 7 of the 9 provinces of the Panamanian data were analyzed in a tetracoric table by chi square test with 5% alpha and 90% of strength and 17.9 OR, to demonstrate if there is any association to *papillomavirus*.

KEYWORDS

Cervix Uteri Cancer, *Human papilloma virus*, Polymerase Chain Reaction, Restriction Fragment Length Polymorphism, Population Infected.

INTRODUCCIÓN

La principal causa de mortalidad por cáncer en los países en desarrollo es el cáncer cervicouterino (Dzul *et al.*, 2004), que mata cada año 230,000 mujeres en todo el mundo (Islas 2002). En algunas poblaciones de Panamá se ha observado un aumento en las mujeres positivas al VPH (Aparicio 2003; Estadísticas RSSM, 2005) y en los últimos años, el Cacu es la principal causa de defunción por tumores malignos en las panameñas mayores de 15 años (Estadísticas vitales, 2002), con una tasa de incidencia para el 2002 de 28.2 por cada 100,000 habitantes y una tasa de mortalidad de 12.9 (Ferlay *et al.*, 2002).

La infección de transmisión sexual más frecuente del mundo es la del VPH (Rivera *et al.*, 2002) y la persistencia de la infección con los VPH de alto riesgo se relaciona con el desarrollo del cáncer (Cortés 2003). Se piensa que la mayoría de la población sexualmente activa está infectada por algún tipo de VPH (Zavaleta 2001), que son virus latentes y se mantienen asintomático por largos períodos de tiempo, para luego desaparecer o manifestarse como una infección subclínica;

por eso su detección y tratamiento no se dan de forma oportuna y así su contagio aumenta diariamente (Abizanda 2003).

Los VPH son virus pequeños de ADN (Spinelly 2003), que se clasifican en tipos diferentes cuando las secuencias génicas de sus oncogenes E-6, E-7 y L-1, altamente conservadas, varían en más de un 10% respecto a las de otros virus conocidos (Marc *et al.*, 1996). Por su potencial oncogénico (Andujar 2004) los tipos de VPH se han clasificado en (Cortés *op. cit.*):

VPH de bajo riesgo: 6, 11, 40, 42-45, 53-55, 57, 59, 67, 69, 71, 74, 82.

VPH de alto riesgo: 16, 18, 31-35, 51, 52, 56, 58, 61, 66, 68, 70, 73.

Los VPH de alto riesgo (VPH-AR) son los que pueden llevar al desarrollo de un cáncer y los VPH de bajo riesgo (VPH-BR) son los que rara vez se convierten en cáncer (Cáncer Facts 2002). Los VPH-BR tipo 6 y 11 suelen asociarse con condilomas y/o lesiones intraepiteliales escamosas (SIL) de bajo grado y los VPH-AR se relacionan con las SIL de alto grado y el carcinoma invasor (Lacruz 2003). La mayoría de las SIL de bajo grado vuelven a la normalidad en unos meses o pocos años, pero a veces se pueden convertir en SIL de alto grado y estas eventualmente en cáncer, en un porcentaje significativo de casos (Cáncer Facts *sup. cit.*).

Existen más de 130 tipos de VPH (Carrano 2002) y los VPH-AR más frecuente en el mundo son el VPH 16 y 18. En América Latina los de mayor prevalencia son: 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58, 59 y el 33, 39 y 59 se concentran en Suramérica y Centroamérica (Rivera *et al.*, *op. cit.*). Sin embargo, en Panamá, aun no se ha llevado a cabo una tipificación para determinar cuales son los tipos de VPH asociados a la génesis de éste cáncer en todo el país. Así que con el fin de identificar los tipos de VPH que se relacionan con el desarrollo del Cacú, en Panamá, se utilizó el kit PVHfast 2.0; que puede detectar más de 50 tipos de VPH, mediante la amplificación de su región L1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este es un estudio analítico de casos y controles, retrospectivo, con una muestra probabilística simple al azar de 87 biopsias con diagnóstico

histopatológico positivo por condiloma o Cacu y 87 controles, se excluyeron los casos de prevalencia y los de extranjeros. El universo está constituido por todas las muestras del país, tomadas por colposcopia, que llegaron al Departamento de Histopatología del Complejo Hospitalario Metropolitano de la Caja de Seguro Social para su diagnóstico entre los años 2001 y 2003. Las muestras positivas y controles fueron procesados con formalina al 10%, e incluidos en parafina, mediante las técnicas histológicas de rutina.

Para extraer el ADN de las muestras y controles se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, 3 cortes de 5 μ m de cada tejido, con 50 μ l de solución de digestión y 50 μ l de proteinasa K. Por cada serie de muestras y controles, se incluyó un control negativo formado por 50 μ l de solución de digestión y 50 μ l de proteinasa K. Se incubaron todos los tubos a 56 °C durante 3 horas, luego a 100 °C por 10 minutos, e inmediatamente se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 minutos y se recogieron unos 100 μ l del sobrenadante resultante, con el ADN.

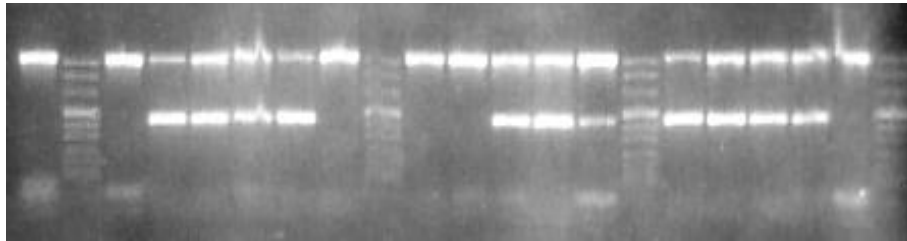
Para purificar el ADN extraído, por cada 100 μ l de ADN se añadió 1 ml de resina de purificación, del kit de purificación de ADN de Genómica, esta mezcla se pasó por una columna de purificación a una velocidad de una a dos gotas por segundo. Luego se pasaron por la columna 2 ml de la solución de lavado, seguidos de 50 μ l de solución de dilución; que se incubó por 1 a 30 minutos, a temperatura ambiente, y se recogieron 50 μ l de ADN en un tubo Eppendorf al centrifugar la columna por 20 segundos, en una microcentrífuga.

Para la amplificación del ADN extraído se tomó un tubo de reacción de PCR de 0.2 ml, del kit PVHfast 2.0, por cada caso y se le añadieron 5 μ l del ADN purificado de las muestras o controles. Se programo el termociclador con un ciclo a 95°C por 9 minutos. 45 ciclos a 94 °C por 0.5 minutos, 55 °C por 1 minuto y 72 °C por 1.5 minutos y un ciclo a 72 °C por 8 minutos. Se dio inicio al programa y al llegar éste a los 90 °C, se colocaron los tubos de reacción en el termociclador. Para visualizar el ADN de los VPH presentes en los productos amplificados por el PCR, se cargaron en geles de agarosa al 2% en TAE 1X; 10 μ l del producto de la amplificación, 2.5 μ l de solución de carga y 10 μ l de “DNA Molecular Weight Marker VII” (Roche Diagnostics), y se corrió una electroforesis a 100 voltios (V) por 50 minutos.

Para el tipaje, en los casos en los que se detectó VPH, se le añadió un microlitro de la enzima, un microlitro de restricción (Rsa1). Se pasaron 20 µl de cada tubo a un tubo Eppendorf (Dig 1) y se les añadió a estos tubos un microlitro de la enzima 2 de restricción) Dig 1+2). Se incubaron los tubos de ambas digestiones enzimáticas en un baño a 37 °C, por 2 horas. Luego en geles de agarosa al 2.5% en TAE 1X, cargamos por cada caso; 2.5 µl de la solución de carga, 10 µl de la muestra de la primera digestión, 10 µl de ambas digestiones, 10 µl del marcador de peso molecular y se corrió la electroforesis a 100 V por 50 minutos.

RESULTADOS

En las 87 muestras positivas las edades de los pacientes van de 18 a 89 años, el 65% de ellos están en la edad productiva entre 20 y 49 años. Tenemos muestras de todas las provincias de Panamá, con un 15% de SIL de bajo grado 40% SIL de alto grado 6% de Cacu microinvasor y un 39% de Cacu invasor.



Calle:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

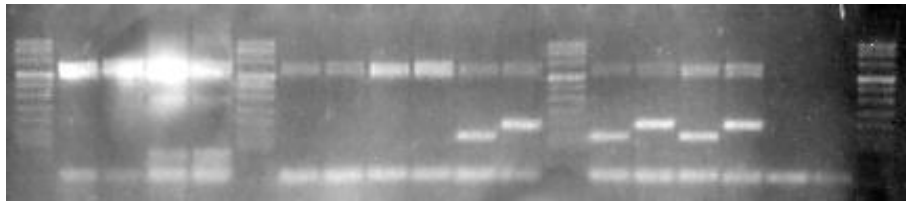
Fig. 1. Visualización del VPH en los productos amplificados por PCR.

En este gel los marcadores de peso molecular se localizan en las calles 2, 9, 15 y 21; presentando las bandas de 1114 pb, 900 pb, 692 pb; la banda de 501 pb y la de 489 que se ven como una sola banda y siguen otras bandas más pequeñas. Las muestras positivas se ven en las calles 4, 5, 6, 7, 12, 13, 14, 16, 17, 18 y 19; en las que se observan las bandas de 890 pb y 450 pb, correspondientes al ADN control y a la región L1 del VPH respectivamente. El control negativo en la calle 20 y las muestras negativas en las calles 1, 3, 8, 10 y 11; no presentan la banda de 450 pb.

Cuadro 1. Patrones de restricción para la enzima 1 y la enzima 1+enzima 2 de los VPH 6, VPH 16 y VPH 18 (Genómica 2003).

TIPO DE VPH	ENZIMA 1 Banda en pares de bases (pb))	ENZIM 1 + 2 Banda (pb)
VPH 6	161, 149, 72, 67	149, 94, 72, 67, 67
VPH 16	310 – 72 – 70	310, 72, 70
VPH 18	135-125-85-72 –38	125, 112, 85, 72, 38

En la visualización del ADN de las muestras positivas, 15 casos (17.2%) presentan una banda de 450 pb correspondientes al genoma del VPH. En 7 de las 9 provincias del país encontramos infección por VPH, entre las edades de 18 y 80 años.



Calle:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Fig. 2. Visualización del tipaje de los VPH por digestión con enzimas de restricción.

Los marcadores de peso molecular se colocaron en las calles 1, 6, 13 y 20. En éste gel la muestra 37 con una coinfección de PVH 16 y 18, tiene en la calle 4 tiene una dig. 1+2 con una banda de 310 pb del PVH 16 y una banda de 125 pb del PVH 18 y en la calle 5 su dig. 1 tiene una banda de 310 pb del PVH 16 y una banda de 135 pb del PVH 18. La muestra 16 con un PVH 6, tiene en la calle 11 la dig. 1+2 con una banda de 149 pb del PVH 6 y en la calle 12, la dig. 1 con una banda de 161 pb del PVH 6. La muestra 9 en la calle 14 y 15, y el control 1, en la calle 16 y 17; presentan las mismas bandas de un PVH 6.

El resultado del tipaje de los VPH por digestión enzimática confirma la presencia de los VPH 6, 16 y 18 en el país. Se encontraron VPH-BR en 3 provincias, VPH-AR en 6 provincias y en 2 de las provincias se encontraron pacientes coinfectados por el VPH 16 y el VPH 18. El 80% de los VPH se observan entre las edades de 18 a 49 años y el 46.6% de los infectados son de las provincias de Panamá y Colón. El VPH 6 se observa entre los 18 y 49 años, el VPH 16 entre los 36 y 37 años y el VPH 18 se observan entre los 35 y 76 años. El PVH 6 se encontró en las SIL de Bajo Grado y los PVH 16 y 18 se encontraron en las SIL de alto grado y los Cacú invasores.

Cuadro 2. Muestras positivas por provincia, Tipaje con su diagnóstico histopatológico, riesgo oncogénico y edad.

Provincia	Muestras Positivas	Tipo de VPH	Diagnóstico Histopatológico	Riesgo Oncogénico	Edad
B. del Toro	1				
Coclé	12	16	Invasor	Alto	37
		18	Invasor	Alto	74
Colón	2	6	Condiloma	Bajo	32
		18	Invasor	Alto	36
Chiriquí	7	16	Invasor	Alto	80
		18		Alto	
		18	Invasor	Alto	76
Darién	2	16	In situ	Alto	36
Herrera	4	6	Condiloma	Bajo	27
Los Santos	5				
Panamá	44	6	Condiloma	Bajo	49
		6	Condiloma	Bajo	18
		16	Microinvasor	Alto	30
		18		Alto	
		18	In situ	Alto	38
		18	Invasor	Alto	35
18	In situ	Alto	35		
Veraguas	10	18	Microinvasor	Alto	42

Cuadro 3. Tabla Tetracórica, para el χ^2 (χ^2).

	Casos	Controles	Total
VPH-BR y VPH-AR positivo	15	1	16
VPH-BR y VPH-AR negativo	72	86	158
Total	87	87	174

$$\chi^2 = \left[\frac{(\text{casos positivos})(\text{controles negativos}) - (\text{controles positivos})(\text{casos negativos})}{(\text{total de casos})(\text{total de controles}) - (\text{total de VPH positivos})(\text{total de VPH negativos})} \right]^2 N$$

$$\chi^2 = 13.5$$

El valor de χ^2 indica que hay significación estadística en los resultados, por lo tanto los VPH, están asociados al desarrollo del Cacú, en Panamá, entre los años del 2001 al 2003.

En cuanto a la magnitud de la asociación causal por la prueba de productos cruzados o de desigualdad relativa Odds Ratio (*OR*):

$$OR = \frac{(\text{casos +})(\text{casos -})}{(\text{controles +})(\text{casos -})}$$

El valor de la *OR* 17.9 indica que entre el 2001 y el 2003, en Panamá, las pacientes infectadas con los VPH-AR, tenían 17.9 veces más probabilidades de desarrollar el Cacú, que las pacientes que no estaban infectada por estos VPH.

La precisión de la asociación por los límites de confianza de la prueba, con una $Z = 1.64$ y donde utilizamos una curva de dos colas.

$$LC = \text{Límite de confianza} = \left(1 \pm \frac{Z}{\sqrt{\chi^2}} \right) \cdot OR$$

$$LC = 17.9$$

$$LC \text{ Inferior} = 5$$

$$LC \text{ Superior} = 63.6$$

El límite de confianza inferior de 5 y el límite de confianza superior de 63.6, indican que el estudio tiene una buena precisión y que cada vez que se repita el estudio se confirmará una relación entre el VPH y el Cacú.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

En las muestras detectamos VPH-BR (4.5%) y VPH-AR (12.6%) en 7 de las 9 provincias de Panamá. Los VPH 6 (4.5%) se encontraron en las SIL de bajo grado y los PVH 16 (3.4%) y 18 (9%) en las SIL de alto grado y en los Cacú invasores. Estos porcentajes son bajos en relación a la prevalencia mundial (Cortés *op cit.*), pero identificamos que la baja detección de VPH se relaciona con la inhibición de la polimerasa por el contacto excesivo de la formalina con las muestras y al tiempo que algunas muestras llevan en parafina. Además, la rebaja de algunos bloques eliminó los VPH presentes en las muestras y la mala adaptación de las columnas de purificación causó la pérdida de algunas muestras. En los controles sólo se detectó una muestra con el VPH tipo 6, en una paciente con diagnóstico histopatológico de Cervicitis Crónica.

Del 2001 al 2003, en Panamá, las mujeres entre 30 y 80 años presentaron infecciones cervicovaginales con VPH-AR, con 17.9 más probabilidades de desarrollar el Cacú invasor en comparación con las pacientes que no presentaban estos VPH-AR. La magnitud de la asociación causal entre los VPH-AR y el Cacú puede ser hasta de 70 (Cortés *op cit.*).

La detección y tipificación del VPH por identificación genómica nos permitió identificar VPH en muestras que histopatológicamente no tenían diagnóstico de VPH y en los casos diagnosticados con algunas

de las fases del Cacú, se pudo determinar la presencia del VPH, cuantos tipos de VPH tenía la paciente y el riesgo oncogénico por los VPH presentes. Por lo tanto, permite se logro un pronóstico objetivo de la evolución de las lesiones neoplásicas, aportando una fuente de información que proporciona las bases para modificar el manejo de las pacientes infectadas con el VPH, de forma que se mejore su calidad de vida con la aplicación de los tratamientos de acuerdo al potencial de malignidad de las lesiones. Se puede evitar los sobre tratamientos ante lesiones con posibilidad de regresión o iniciando el tratamiento temprano ante lesiones con alta tendencia a progresar hasta un carcinoma invasor.

Tenemos VPH en todo el país, aún en provincias en las que anteriormente, entre el 2001 y 2003, no lo habíamos hecho. En 2002, Bocas del Toro tiene 5 defunciones por Cacú y Los Santos tiene 4 defunciones por Cacú (Anónimo, estadísticas vitales, 2002). Estas provincias son destinos internacionales de turismo o de carnavales, por lo que se aumenta las posibilidades de presentarse tipos de VPH de otras regiones del mundo.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En Panamá, en el periodo comprendido entre 2001 y 2003, encontramos la presencia de los VPH 6, 16 y 18. En los diagnósticos de Condiloma, SIL de bajo grado, SIL de alto grado o de Carcinoma Invasor es necesario la aplicación de la tipificación de los VPH. Se evita así, el sobretratamiento de las pacientes con los VPH-BR ó el retraso de un tratamiento efectivo en el caso de las infecciones por VPH-AR.

Encontramos VPH en 7 de las 9 provincias de Panamá, por lo que consideramos que se debe realizar un estudio a nivel nacional, con muestras frescas, para identificar los tipos de VPH relacionados con el Cacú y determinar la posibilidad de la aplicación de una de las vacunas en desarrollo que cubra los tipos de VPH que se presentan en el país.

Durante el estudio no fue posible tener una estadística con la información sobre la situación real del Cacú en Panamá durante los años del 2001 al 2003, además en algunas regiones de salud se utilizan las diferentes clasificaciones de las etapas del Cacú sin tomar en

cuenta los términos que son sinónimos, por lo que la información final tiene diferencias respecto a la realidad nacional del comportamiento de esta patología. Consideramos que el país debe tener un departamento que integre la información estadística de las diferentes instituciones que realizan diagnóstico del Cacú en el territorio nacional, de forma que se tenga una información real, actualizada, de libre acceso y con criterios unificados.

REFERENCIAS

Abizanda, M. 2003. Diagnóstico Precoz del Cacú. El Médico Interactivo. Diario Electrónico de Sanidad; 892: tema 8-6.

Andujar, M. S. 2004. Virus y Cáncer. Instituto Canario de Investigación del Cáncer, 1:14

Aparicio, G. 2003. En San Miguelito, 714 mujeres están expuestas al cáncer. EL PANAMA AMERICA – EPASA. Viernes 10 de octubre.

Cancer FACTS. 2002. Los Virus del Papiloma Humano y el Cáncer, 3.2Os, 5 pág.

Carrano, J. R. 2002. Importancia de la Tipificación del Virus Papiloma Humano (VPH). Revista Venezolana de Oncología; 14(3): 3 pág.

Cortés, Y. 2003. Papilomavirus y Cáncer de cérvix. Rev. Colombiana de Obstetricia y Ginecología, vol. 54 N° 2 : 5 pág.

Dzul, R., K., M. S. Puert & L. M. Gonzalez. 2004. Cáncer cervicouterino: métodos actuales para su detección. Revista Biomédica. 115: 4-9

Estadísticas de la R.S.S.M. 2005.

Estadísticas Vitales. 2002. Contraloría General de la República de Panamá, 3:120.

Ferlay, et al., Globocan. 2002. Lyon: Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer: 3.

Genomica. 2003. pvhFAST 2.0. Detección y tipado de Papilomavirus Humano mediante identificación genómica para diagnóstico in vitro, versión 1.0, 30 pág.

Islas, V. 2002. Cáncer cervicouterino El Cáncer que no debe matar. Agenda Salud. Isis Internacional, Santiago. Chile enero-marzo, N° 25; 8.

Lacruz, C. P. 2003. Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolau a Bethesda 2001). Revista Española de Patología. 36:1-6.

Marc, F., Q. WIM y colaboradores. 1996. Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of Human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. Journal of Clinical Microbiology. 34 (3): 745-747.

Rivera, R., J. Aguilera, A. Larraín. 2002. Epidemiología del VPH. Revista Chilena de Obstetricia Ginecológica. Vol. 67(6): 5 pág.

Spinelli, O. M. 2000. HPV, P53 y Apoptosis: una interacción peligrosa. XII Congreso Latinoamericano. I Congreso Boliviano y X Reunión Iberoamericana: Citología:10.

Zavaleta, L. R. 2001. Papiloma. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. UNAM. Material didáctico de virología para apoyo de profesores y alumnos; 10 pág.

Recibido agosto de 2006, aceptado agosto de 2007.