

Alfredo Campoverde Cisneros (1), Mauro Arcentales Cayamcela (2), Jhon Caguana Mayancela (2).

(1) Director e Investigador del Centro de Diagnóstico y Estudios Biomédicos de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Cuenca.

(2) Estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad de Cuenca.

Correspondencia: alfredo.campoverde@ucuenca.edu.ec

RESUMEN

OBJETIVO: Determinar la prevalencia de los genotipos del papiloma virus humano en muestras cérvico-uterinas y su relación con los factores de riesgo en mujeres con vida sexual activa de la ciudad de Cuenca.

METODOLOGÍA: Estudio observacional de tipo transversal con una muestra de 500 mujeres del cantón Cuenca de los Hospitales Monte Sinai y del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social (IESS). Los exámenes se realizaron en el laboratorio de Biología Molecular BIONCOGEN de la ciudad de Cuenca y se utilizó la técnica de PCR en Tiempo Real más el examen de Papanicolaou.

RESULTADOS: La prevalencia del VPH fue de 78.4% y el genotipo más frecuente es el HPV 16 con el 26,2%. El NIC I con el 27% constituye la patología ginecológica más frecuente.

CONCLUSIÓN: Los genotipos 16 /18 representan los tipos de VPH que están relacionados directamente con el desarrollo de cáncer cérvico uterino ya que al correlacionar con la citología (Papanicolaou) se demuestra que la célula sufre cambios morfológicos (coilocitosis).

Palabras clave: Genotipo, Papillomavirus Humano 16, Papillomavirus Humano 18, Técnicas de Laboratorio Clínico, PCR, Factores de riesgo; Hospital Monte Sinai, Hospital del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social, Cuenca-Ecuador.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To determine the prevalence of human papilloma virus genotypes in cervical-uterine samples and their relation to risk factors in women with active sex life in Cuenca.

METHODOLOGY: It is a cross-sectional observational study with a sample of 500 women from Cuenca who were attended in the Monte Sinai Hospital and the Ecuadorian Institute of Social Security (IESS). The exams were carried out in the BIONCOGEN Molecular Biology Laboratory which is located in Cuenca. The Real Time PCR technique plus the Pap examination were used.

RESULTS: The prevalence of HPV was 78.4 % and the most frequent genotype was the HPV 16 with 26.2 %. On the other hand, the CIN I with 27% is the most frequent gynecological pathology.

CONCLUSION: The genotypes 16/18 represent the types of HPV that are directly related to the development of cervical cancer because when it is correlated with cytology (Pap) it is demonstrated that the cell undergoes morphological changes (koilocytosis).

Keywords: Genotype, Human papillomavirus 16, Human papillomavirus 18, Clinical Laboratory Techniques, PCR; Risk factors; Monte Sinai Hospital, Hospital of the Ecuadorian Institute of Social Security, Cuenca-Ecuador.

INTRODUCCIÓN

El cáncer del cuello del útero es un grave problema de salud en el país y región. En los últimos 10 años se ha incrementado la mortalidad por esta causa; realidad directamente vinculada a los escasos programas de detección oportuna y tratamiento de esta patología. Desde 1986 es posible determinar mediante pruebas de laboratorio de biología molecular, con la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa), los genotipos de alto grado oncogénico que predisponen con alta probabilidad a desarrollar el cáncer cérvico uterino y, además, identificar los genotipos de bajo grado oncogénico. A pesar de ello, existe el problema grave de no conocer la distribución de estos genotipos en los hospitales privados y públicos de Cuenca por lo que se hace imperioso implementar de mejor forma las normas de detección temprana, diagnóstico y tratamiento de este cáncer, así como el no conocer su correlación con las características cito patológicas del cuello uterino.

Factores de Riesgo

Los principales factores de riesgo para las mujeres por infección VPH son: edad, raza no blanca, alto consumo de bebidas alcohólicas y tabaco, uso prolongado de anticonceptivos orales, inicio temprano de relaciones sexuales, alto número de parejas sexuales, trauma cervical durante el parto, factores genéticos y ciertos factores hormonales endógenos asociados con el embarazo (1).

Epidemiología.

Un meta análisis mundial observó que el VPH 16 fue el tipo más frecuente (26.3%), seguido de VPH 31 (11.5%), VPH 51 (10.6%) y VPHV 53 (10.2%). En las lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL), que comprende las llamadas neoplasia intraepitelial cervical grado 2 (CIN 2) y neoplasia intraepitelial cervical grado 3 (CIN 3), el espectro de tipos virales es más restringido, con predominio de los VPH-AR, en especial VPH 16 y 18 (50%) (2).

El cáncer cervical ocupa el tercer lugar a nivel mundial, de los cánceres más comunes que afectan a las mujeres que viven en países en vías de desarrollo, cerca de 528.000 nuevos casos de cáncer cervical aparecen cada año en todo el mundo con una tasa de incidencia de 24.1 por 100.000 mujeres en América de Sur (3).

En España se estima una tasa de incidencia para el cáncer de vulva del 0.8 por 100.000 y para el cáncer de vagina, del 0.0 por cada 100.000 mujeres. en un estudio realizado en 86 muestras procedentes de biopsias bulbares y vaginales obtenidas en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid, con el objeto de determinar

la distribución de los genotipos del virus del papiloma humano (VPH) y el nivel de coinfección.

Se obtuvo los siguientes resultados Los genotipos de HPV más frecuentemente encontrados fueron el VPH-6 (10.3%; IC 95%: 6.6-15.1%), el VPH-16 (8.5%; IC 95%: 5.2-13%) y el VPH-11 (7.6%; IC 95%: 4.5-11.9%). El VPH-18 solamente fue detectado en el 0.9% (IC 95%: 0.1-3.2%) del total de virus encontrados en todas las lesiones. La coinfección por distintos genotipos del VPH se halló en el 30.2% del total de las lesiones (4).

En el 2015 en México, el Cáncer de cuello de útero fue la segunda neoplasia de mayor frecuencia y la cuarta causa de incidencia y mortalidad por cáncer en la mujer a nivel mundial. En la población mexicana se ha reportado que los genotipos de VPH-16, -18, -31, -45 y -58 son los de mayor prevalencia en muestras de cérvix;4. Sin embargo, la mayoría de estos estudios tienen ciertas limitaciones debido a las metodologías empleadas para el tamizaje y la genotipificación (pues han identificado solo ciertos tipos virales), ya que en un porcentaje del 5 al 8 % no se detectó VPH en CaCu, cuando está reportado que menos del 0.1 % de las muestras de Cáncer de cuello de útero son negativas a VPH (5).

En el 2014 en Habana, Cuba entre el 1 de junio 2012 y 31 de mayo de 2013 se realizaron 1282 citologías de cuello de útero a mujeres de edad media entre 40 a 59 años de las cuales 177 de ellas (13.8) presentaron infección de HPV lo que demuestra que, 1 de cada 6 mujeres de 40 a 59 años tiene esta afección. La trichomoniasis, el herpes simple y los condilomas padecieron frecuentemente dichas mujeres cuando tenían la edad entre 15 y 25 años (6).

En el 2015 en Córdoba, Argentina se realizó un estudio de 186 mujeres, edad comprendía entre 18 y 65 años con antecedentes de LIE para lo cual se tomó la muestra de células cervicales para realizar la citología y la extracción de DNA de HPV. Los resultados fueron los siguientes: papiloma virus positivo para 96 mujeres (51.6%), de los cuales 63 mujeres tienen al menos un genotipo de HR-VPH, la lesiones intraepiteliales escamosas de alto y bajo grado están relacionado con las mujeres menores de 35 años. Los genotipos 16 y 6 son los más frecuentes. Se detectaron 7 mujeres con múltiples infecciones de varios genotipos de los cuales el 85% tienen por lo menos un HR-VPH (7).

En el 2015 en Caracas, Venezuela en un estudio realizado en la región central a mujeres cuya edad comprende 12 a 30 años demostró que la frecuencia del HPV fue de 68.7 % (16 991/24 734),

de los cuales 70 % correspondieron a mujeres en rango de edad entre 12 a 30 años. Predominaron los genotipos de bajo riesgo oncogénico con 61.6 %, con respecto a los de alto riesgo 33.5 % y de probable alto riesgo 4.9 %. El genotipo más frecuente para el grupo de bajo riesgo fue la (59.2 %) y para los grupos de alto riesgo y posible alto riesgo fue la 31 (31.4 %) y 53 (99.3 %), respectivamente (8).

En el 2011 en Santiago, Chile se realizó una revisión de las principales bases de datos Medline/Pubmed, ProQuest, CINHALL, Scielo y el buscador Tripdatebase en el periodo transcurrido de diez años dando como resultado la recolección de 63 artículos relacionados con HPV y CC (cáncer de cuello de útero) de los cuales 43 cumplían con los criterios de inclusión. En el 2000 el CC fue la cuarta causa de muerte afectando en primer lugar a las mujeres entre los 20 y 44 años, y en tercer lugar al grupo entre 45 y 59 años. Según el Instituto Nacional de Estadísticas (INE) la tasa de mortalidad es de 8.5 por 100.000 mujeres en el año 2003 esta tasa evidencia el descenso en la disminución de mortalidad en los últimos 10 años, si en 1990 la tasa fue de 14.3 por 100.000 mujeres, también consideran criterios de relación con las ETS (9).

En el 2014, también en Chile, el cáncer cérvico-uterino (CCU) fue la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en la mujer. El principal agente causal es el virus papiloma humano asociados al comienzo precoz de la vida sexual, incrementa las posibilidades de infección con VPH; esto puede implicar un eventual desarrollo prematuro de neoplasia intraepitelial cervical y CCU; este estudio se realizó a 173 mujeres cuya edad era menor a 25 años de edad, atendidas en la Unidad de Patología Cervical del Hospital Hernán Henríquez Aravena de Temuco, entre los años 2004-2012, mediante reacción de polimerasa en cadena se genotipificaron 173 muestras cervicales, los resultados fueron los siguientes la frecuencia global del VPH fue 84.8%. El genotipo más frecuente fue VPH16. En 12.3% la lesión cervical persistió o evolucionó a una mayor. Se encontró 28.9% de mujeres con seguimiento post-lesión irregular; en este grupo, 88% fue VPH (+) y 52% no tuvo registro de Papanicolaou en los últimos tres años (10).

En Colombia un estudio realizado a 547 mujeres, que asistieron a la Liga Contra el Cáncer en Bogotá a practicarse una colposcopia luego de un resultado anormal en la citología: células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS), lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LIEBG) o lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LIEAG), fueron atendidas de manera consecutiva entre octubre de 2010 y diciembre de 2012 donde se obtuvo los siguientes resultados

la prevalencia de VPH fue 76.1%. Se observaron infecciones únicas en el 41.4% de las participantes, y coinfecciones en el 34.6%. La frecuencia de VPH según diagnóstico fue: 60.2%, 84.7% y 84.5% en ASCUS, LIEBG y LIEAG. Los VPH-16 y 58 fueron los tipos más frecuentes en los tres grupos, con frecuencias para VPH-16 de 20.4%, 33.9% y 38.8%, y para VPH-58 de 7.3%, 13.6%, 18.1% para ASCUS, LIEBG y LIEAG. En ASCUS y LSIL el tercer tipo en frecuencia fue VPH-56 (6.8% y 11.0%), mientras que en LIEAG fue VPH-18 (10.3%). Las infecciones con tipos virales probablemente oncogénicos y con tipos de bajo riesgo fueron mucho menos frecuentes y en general se presentaron como coinfecciones con tipos de alto riesgo (11).

En Paraguay, según datos del Globocan 2012, se observa una tasa de incidencia 34.2 por 100.000 mujeres y una tasa de mortalidad de 15.7 por 100.000 mujeres, una de las más elevadas en Latino América Estudio se realizó un estudio en 80 mujeres cuya edad esta entre 21 y 63 años con diagnóstico cito-histológico post SIL tratadas en el Servicio de Patología Cervical del Hospital Materno-Infantil San Pablo del MSP y BS, de enero a diciembre de 2014; Se encontró infección viral en el 7.5% (6/80) de las pacientes tratadas; El VPH-16 estuvo presente en el 50% (3/6) de los casos positivos. No fueron detectadas infecciones con el VPH-18. Se observaron coinfecciones de VPH-16 con por lo menos uno de los otros VPH-AR detectados por el sistema, en el 33% (2/6) de los casos positivos (12).

El método PCR se recomienda especialmente para el diagnóstico clínico y sub clínico de compañeros de mujeres con condilomas genitales o lesiones pre malignas y malignas. A medida que la vacunación esté más disponible, la tamización para el cáncer de cuello uterino debe reformularse para permitir un sinergismo máximo entre citología y detección de anticuerpos ADN contra el virus del papiloma humano. La utilización masiva de la vacunación depende de las políticas de salud pública destinadas a la creación de programas que contemplen su uso en la población en riesgo (13).

Está comprobado que la infección por el virus del papiloma humano (VPH) es una de las infecciones de transmisión sexual más frecuentes y actualmente se considera a ese virus como el agente causal del carcinoma cérvico uterino.

Se han descubierto hasta el momento más de 200 genotipos de VPH; de acuerdo a su potencial oncogénico, divididos en tipos de alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, asociados con cáncer uterino y lesiones intraepiteliales escamosas de bajo y alto grado (LIEBg y LIEAg) y genotipos de bajo riesgo: 6, 11, 42, 43, 44 (14,15).

Datos obtenidos de la OMS sugieren que el CCU es el segundo tipo de cáncer más frecuente en las mujeres de las regiones menos desarrolladas, y se estima que en 2012 hubo unos 445 000 casos nuevos (84% de los nuevos casos mundiales). En 2012, aproximadamente 270.000 mujeres murieron de CCU; más del 85% de esas muertes se produjeron en países de ingresos bajos y medianos. En muchos países se ha aprobado la vacunación contra los PVH 16 y 18 (15,16).

Un estudio realizado en Ecuador, en 250 mujeres, identificó HPV 16 y 18 en coinfección en lesiones intraepiteliales de alto grado; se identificó al HPV 16 en lesiones de bajo grado; este estudio concluye que la PCR tiene el potencial para proporcionar información epidemiológica importante en muchas zonas de escasos recursos de los países en desarrollo (17).

En el Hospital Metropolitano, Quito, Ecuador, en base al antecedente de que hay limitados estudios en el país sobre genotipo del papiloma virus humano en lesiones ginecológicas, y que es necesario predecir cómo influirá en la vacunación VPH y proyección de VPH en prevención del cáncer cervical, se investigó a 124 de las mujeres, adultas de 18 a 55 años de edad, mestizas (hispanas), que nacieron y viven en Quito. Se encontraron 23 genotipos diferentes. 84/104 positivos para VPH (67.7%); 32/124 casos fueron negativos (25.8%); y, en casos de 8/124 (6.5%) no se ha podido determinar la existencia o falta de VPH.

El genotipo viral más común fue 6 (8.8%), seguido por el 66 (4.8%) y 16, 31, 44 tipos (2.4% cada uno). Tipos de 11, 34, 35, 54, 59, 62 y 67 mostró una frecuencia equivalente a (1.6% para cada uno). Los tipos restantes mostraron una frecuencia de 0.8%.

Los genotipos de alto riesgo más comunes fueron 16 y 31; 6 de bajo riesgo y 41 y el tercero más común de PH, grupo detectado en esta cohorte, fue VPH 66. VPH 6 mostró la mayor prevalencia. VPH 66 se asoció con citología atípica y fue encontrado en las mujeres con citología limítrofe, lesiones de baja y alta calidad, pero fue más frecuente en el grupo de umbral. Se examinó un caso de coexistencia de 2 genotipos juntos 51 y 58. Encontraron muy baja prevalencia de HPV18 solo o HPV16 y 18. En 25 muestras, 20.16% (25/124) se encontró presencia de VPH, pero no pudieron identificar el genotipo. Se necesita más estudios con una amplia muestra para completar un patrón geográfico de distribución de VPH (18).

El Departamento de Medicina de la Universidad de Indiana realizó un estudio en Santa Elena, Guayas-Ecuador, para determinar HPV con la prueba de reacción en cadena de polimerasa (PCR). Se estudiaron 302 participantes con una edad pro-

medio de 37.7 años (rango de 18 a 78 años). Los serotipos más frecuentemente detectados, fueron: 16, 52, 58 y 59, 62, 71, 72 y 83. El número de parejas sexuales fue positivamente asociado con la detección de cualquier tipo de VPH. Concluyen manifestando que se necesitan más estudios para determinar si estos resultados son representativos de todas las mujeres ecuatorianas y para determinar si el cáncer cervical en las mujeres ecuatorianas es causado por los mismos tipos de VPH encontrados en las muestras recogidas con los hisopos obtenidas en este estudio (19).

En otro estudio se investigó a mujeres con lesiones cervicales que viven en Ecuador. Un total de 71 casos, de los cuales 31 casos (43.7%) fueron VPH positivos. Entre los casos positivos, los genotipos más comunes fueron HPV 16 (64.5%) y VPH 81 (29%) seguido por VPH 31, 53, 56 y 58, en orden decreciente de prevalencia. Diecisiete (85%) VPH-16 aislados fueron clasificados como europeo y tres (15%) como variante 1 africano sobre la base de nucleótidos presente dentro de la secuencia de MY09/MY11 L1. Los resultados sugieren que el VPH 16 tiene una muy alta prevalencia entre las mujeres con lesiones cervicales en Ecuador; por lo tanto, una vacuna de VPH-16 base eficaz debe impedir el desarrollo de cáncer cervical en una gran proporción de las mujeres ecuatorianas (20).

Un estudio realizado en Cuenca-Ecuador en el 2006, se investigó a 70 pacientes con lesiones de cérvix uterino mediante la técnica de PCR. Los resultados mostraron un 55.71% (39 casos) de casos positivos para DNA viral. El rango de edad estuvo comprendido entre los 39-48 años. De los 39 casos, 22 fueron positivos para DNA viral de alto grado (31.43%); para grado intermedio 13 casos (18.57%); y bajo grado 4 (5.71%). En los de alto grado (31.43%) el tipo 16 fue el de mayor frecuencia.

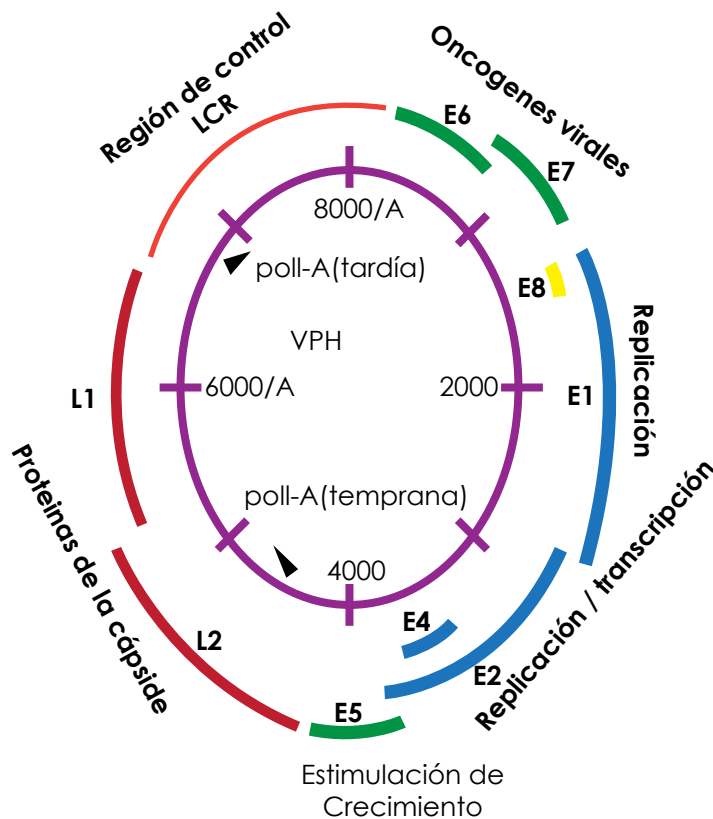
La alta incidencia de HPV de alto riesgo oncogénico sugiere que debe considerarse la determinación del DNA. viral como un método complementario en las pacientes con diagnóstico citológico de ASCUS (21).

En el Ecuador la prevalecía del cáncer de cuello uterino se ha mantenido sin una reducción significativa durante los últimos 20 años. Según el INEC en el año 2008 se detectaron a nivel nacional 304 casos de muerte por cáncer de cuello uterino.

Durante el año 2008 se detectaron 1224 nuevos casos de cáncer de cuello uterino, y desde el año 2005 la incidencia aumentó en un 60%. En el Azuay se realizaron 26.253 citologías durante el año 2007, pese al gran volumen, la cobertura, para el año 2009 no alcanza el 10% de la meta esperada en la provincia (22).

GRÁFICO No. 1

Patogenia de la infección por VPH.
Acciones de las distintas proteínas codificadas por VPH

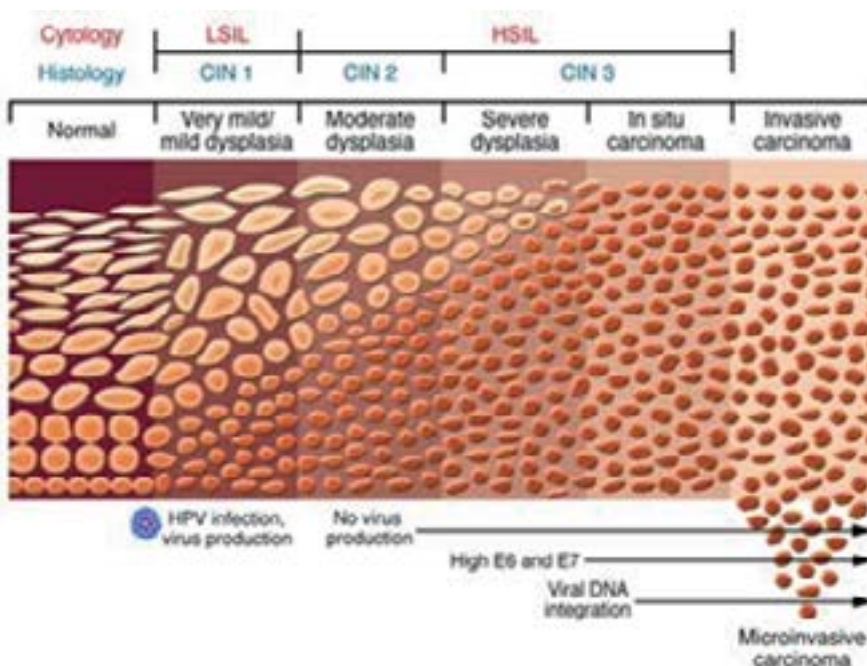


Una vez que las células son infectadas por VPH comienza la replicación del virus gracias a factores de transcripción de la célula hospedera y la proteína E1 viral. E7 se une a la proteína retinoblastoma dejando libre al factor de transcripción E2F, lo que permite la activación de genes que aumentan la proliferación celular. La oncoproteína E6 es capaz de inducir la ubiquitinización y posterior degradación de p53, lo que conlleva a disminución de la apoptosis mediada por p53. E2 regula la transcripción de las oncoproteínas E6 y E7. La proteína E5 aumenta la acción de las quinasas celulares lo cual promueve la proliferación y disminuye la diferenciación celular. E4 ayuda al ensamblaje de las proteínas de la cápside viral L1 y L2 para el empaquetamiento de los viriones de VPH (16).

Fuente: Lelo de Larrea 2012

GRÁFICO No. 2

Resultado de los genotipos
en base a las Curvas de Melting



Las mujeres son infectadas por alguno de estos virus poco tiempo después del inicio de la vida sexual activa, y la mayoría de las infecciones ocurren en mujeres menores de 25 años. Después de esa edad, la prevalencia disminuye rápidamente. En mujeres de edad media, las infecciones por HPV son transitorias, volviendo a observarse un incremento en las infecciones en mujeres de 30 años. El CaCu está caracterizado por una fase pre-maligna bien definida, la cual puede ser detectada por examen citológico de células cervicales exfoliadas (prueba de Papanicolaou).

Desde la implementación de la citología (Pap), la tasa del CaCu ha disminuido considerablemente, y a pesar de que la mayoría de las mujeres que han fallecido por CaCu nunca se realizaron una prueba de Pap, muchas de

Fuente: José Manuel Ojeda F. 2010

ellas recibieron resultados negativos de su prueba. Esto se debe a que la sensibilidad de la citología es limitada por el error del muestreo, donde pocas células son colocadas en el frotis, agregándose el error de interpretación, donde pocas células anormales no son identificadas entre la multitud de células normales que también se encuentran en el frotis cervical bien tomado. El error de muestreo más común es la falta de células de la zona de transición cervical.

Los cambios premalignos cervicales representan un espectro de anomalías histológicas que van desde un NIC 1 (displasia leve), NIC 2 (displasia moderada) y NIC 3 (displasia severa/carcinoma in situ) hasta cáncer invasivo. Aunque el tratamiento de los cambios cervicales premalignos es eficaz, también es un procedimiento ineficiente. Esto se debe a las incertidumbres que rodean a la historia natural de la neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Las pruebas citológicas e histológicas, no pueden distinguir a las pocas mujeres con frotis anormales, que progresarán hacia un cáncer invasivo de la vasta mayoría que presentan anomalías que presentarán regresión espontánea (22).

OBJETIVO GENERAL

Determinar la caracterización de los genotipos frecuentes del virus del papiloma humano en mujeres atendidas en los hospitales Monte Sinai y del Seguro Social (IESS). Cuenca-Ecuador. 2008- 2014.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la caracterización de los genotipos de Papiloma Virus Humano de alto y bajo riesgo oncogénico, en muestras cérvico uterinas de mujeres con vida sexual que acuden a los hospitales Monte Sinai y del IESS, utilizando como método la PCR en tiempo real para detectar 19 genotipos de alto riesgo: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82; y 9 genotipos de bajo riesgo: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70; relacionarlos con la edad y las lesiones intraepiteliales detectadas mediante el estudio citopatológico (Papanicolaou).
2. Establecer si existe relación de los genotipos del HPV, con la edad, las lesiones intraepiteliales detectadas mediante el estudio citopatológico (Papanicolaou).
3. Establecer la caracterización de la infección por el papiloma virus humano, y su relación con los factores de riesgo para las lesiones premalignas y malignas del cuello uterino.
4. Elaborar un programa educativo de promo-

ción, prevención, identificación y seguimiento de las enfermedades de transmisión sexual y del cáncer de cuello uterino, para ingresarlos en la página WEB del Ministerio de Salud y de las Universidades de Tumbes y de Cuenca.

METODOLOGÍA

La presente investigación utilizó un estudio epidemiológico observacional de tipo transversal y correlacional. La Población lo constituyeron todas las 500 pacientes de los Hospitales Monte Sinai y del IESS que han acudido al Laboratorio de Diagnóstico Molecular BIONCOGEN durante el período establecido en la investigación y se analizó toda la muestra.

Criterios de inclusión. Mujeres que residen en Cuenca con edades entre los 15 a 76 años, que acudan al servicio de ginecología de cada hospital, que hayan tenido relaciones sexuales, de cualquier condición social y étnica, que deseen participar en la investigación.

Criterios de exclusión. Mujeres embarazadas, mujeres que se encuentren menstruando, aquellas que presentan hemorragia uterina o que su condición de salud no permita una exploración ginecológica para la toma de muestra cérvico uterina. Mujeres que se nieguen a participar en la investigación.

Extracción del ADN.

Para la extracción de ADN total de cada una de las muestras se utilizó el kit de preparación High Pure Template (Roche, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para esto cada uno de los eppendorf que contenga la muestra, ya sin el cepillo citobrush, se centrifugó por 1 minuto a 13000 revoluciones para precipitar la muestra al fondo del eppendorf y eliminar el PBS.

A las muestras ya sin PBS, se les adicionó 200 µl de Buffer de Lisis de Tejido más 40 µl de proteinasa K; las muestras fueron homogenizadas en vortex e incubadas a 55 °C por una hora en un thermomixer. Luego de este período a cada tubo eppendorf que contiene la muestra ya lisada, se le añadió 200 µl de Binding buffer y se homogenizó por 15 seg en vortex, para luego ser incubados a 70 °C por 10 minutos en una incubadora de rotación. Posterior al tiempo de incubación, a cada una de las muestras se les añadió 100 µl de isopropanol y se las homogenizó en el vortex.

La solución fue procesada utilizando columnas de elusión. Para esto, se transfirió todo el volumen de solución al filtro de la primera columna, la misma que fue centrifugada a 9300rpm en una centrífuga.

ga de temperatura a 25 °C. La columna con el sobrenadante fue desechada y el filtro se colocó en la siguiente columna, al mismo que se le añadió 500 µl de Inhibidor removal buffer; y se lo centrifugó nuevamente a 9300 rpm en la centrífuga a temperatura de 25 °C.

Se desechó la columna con el sobrenadante, colocando al filtro en una nueva columna, al mismo que se le añadió 500 µl de Buffer de lavado y se lo centrifugó tal como los pasos anteriores.

Se realizaron dos lavados del filtro, posterior a esto solamente se colocó el filtro en un tubo eppendorf de 1,5 ml, mientras que la columna fue desechada.

Se añadió 200 µl de Buffer de elusión (previamente calentado a 70 °C por 5 minutos) a cada uno

de los filtros y se los centrifugó junto con el tubo eppendorf a 9300 rpm. Al final se desechó el filtro y en el eppendorf nos queda 200 µl de ADN en suspensión.

PCR Real Time TOCE (Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension)

HPV28AnyplexTMII es un ensayo in vitro cualitativo para la detección de los virus del papiloma en citología de base líquida y muestras de frotis cervicales.

La detección de HPV28AnyplexTMII consta de dos reacciones de PCR (set A y set B). Es un ensayo múltiple que permite la amplificación simultánea de ADN del virus del papiloma humano de alto riesgo y bajo riesgo.

SETS	GENOTIPOS
A	14 tipos de Alto Riesgo (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53,56, 58, 59, 66, 68,69,73,82).
B	5 tipos de Alto Riesgo (26, 53, 69, 73, 82). 9 tipos de Bajo Riesgo (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70).

La detección es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real que permite la amplificación simultánea, detección y diferenciación de ácidos nucleicos de 19 tipos de VPH de alto riesgo (16, 18, 26,

31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82) y 9 tipos de bajo riesgo del VPH (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70), así como de control interno (CI).

GRÁFICO No. 3

Resultado de los genotipos en base a las Curvas de Melting



Fuente: Seegene AnyplexTM II HPV28 Detection.2014

Análisis Estadístico

Los datos registrados en el formulario de recolección de la información y el resultado de los dos exámenes de laboratorio, de cada mujer investigada, fueron introducidos en el programa estadístico SPSS versión 22, se dispuso para ello la colaboración de un médico con especialización en bioestadística. El modelo estadístico que se utilizó

corresponde al de los estudios de prevalencia y correlación. Se determinó: frecuencias, porcentajes, media, mediana, moda para determinar la prevalencia del VPH de acuerdo a la edad. Para valorar la relación de los genotipos con los factores de riesgo se utilizó el Odds Ratio (OR) e intervalo de confianza (IC).

RESULTADOS

TABLA No. 1

Distribución Numérica y Porcentual de la Prevalencia del VPH en: la población estudiada. Cuenca 2008-2014.

VPH	No	%
Positivo	392	78.4
Negativo	108	21.6
Total	500	100

Fuente: Base de datos.
Elaboración: Los autores

La prevalencia del VPH fue del 78.4% en la población estudiada

TABLA No. 2

Distribución Numérica del VPH por grupos de edad, en mujeres con vida sexual activa. Cuenca 2008 – 2014.

EDAD	Mínimo	Máximo	Promedio	DE
	15	76	33.6	9.5

EDAD EN AÑOS	PORCENTAJE
15-24	16.4
25-34	45.6
35-44	24
45-54	10.8
55-64	2.2
65-74	0.8
>74	0.2
Total	100

Fuente: Base de datos.
Elaboración: Los autores

El promedio de la edad es el mínimo 15 y el máximo 76 años con un promedio de 33 años. El grupo etáreo donde más casos se observó es el comprendido entre los 25 a 34 años.

TABLA No. 3

Distribución numérica y porcentual de la Prevalencia del VPH de alto y bajo riesgo según el tipo de lesión cérvico uterina. Cuenca 2008-2014.

DIAGNOSTICO GINECOLÓGICO	n	%
INVESTIGACION HPV	254	50,8
NIC I	135	27
ASCUS	46	9.2
NIC II	23	4.6
INFLAMATORIO	22	4.4
CONDILOMAS	16	3.2
DISPLASIA LEVE	3	0.6
NIC III	1	0.2
Total	500	100

Fuente: Base de datos.
Elaboración: Los autores

El diagnóstico ginecológico por el cual acuden las pacientes en un mayor porcentaje es por investigación de VPH en 50,8%, seguido por el NICII en un 27%.

TABLA No. 4

Distribución numérica y porcentual de los casos positivos y negativos de VPH correlacionados con el diagnóstico Ginecológico. Cuenca 2008 - 2014.

	VPH				TOTAL	
	POSITIVO		NEGATIVO		N°	%
ASCUS	40	10.2	6	5.6	46	9.2
CONDILOMAS	13	3.3	3	2.8	16	3.2
DISPLASIA LEVE	1	0.3	2	1.9	3	0.6
INFLAMATORIO	13	3.3	9	8.3	22	4.4
INVESTIGACION HPV	200	51.0	54	50.0	254	50.8
NIC I	106	27.0	29	26.9	135	27
NIC II	19	4.8	4	3.7	23	4.6
NIC III	0	0.0	1	0.9	1	0.2
Total	392	100	108	100	500	100

Fuente: Base de datos.
Elaboración: Los autores

$P = 0.045$ (para la distribución)
La presencia del VPH es más notoria en las pacientes que son derivadas con investigación de VPH 51% seguidas del NIC I con el 27%.

TABLA No. 5

Distribución numérica y porcentual de los grupos de edad y la presencia o no del HPV. Cuenca 2008 - 2014.

VPH	GRUPOS DE EDAD															
	15 a 24		25 a 34		35 a 44		45 a 54		55 a 64		65 a 74		> 74		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Positivo	70	17.9	187	47.7	82	20.9	38	9.7	11	2.8	3	0.8	1	0.3	392	100
Negativo	12	11.1	42	38.9	38	35.2	16	14.8	0	-	-	-	-	-	108	100

Fuente: Base de datos.
Elaboración: Los autores

Se observa que la positividad del HPV es más notoria de los 25 a los 34 años de edad 47.7%.

TABLA No. 6

Distribución numérica y porcentual de los grupos de edad con el diagnóstico Ginecológico. Cuenca 2008 - 2014.

DIAGNÓSTICO	GRUPOS DE EDAD															
	15 a 24		25 a 34		35 a 44		45 a 54		55 a 64		65 a 74		> 74		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
ASCUS	6	13.0	21	45.7	16	34.8	3	6.5	-	-	-	-	-	-	46	100
CONDILOMAS	3	18.8	7	43.8	4	25.0	1	6.3	1	6.3	-	-	-	-	16	100
DISPLASIA LEVE	-	-	3	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	100
INFLAMATORIO	3	16.3	12	54.5	5	27.7	2	9.1	-	-	-	-	-	-	22	100
INVESTIGACION HPV	48	18.9	117	46.1	56	22.0	25	9.8	5	2.0	2	0.8	1	0.4	254	100
NIC I	21	15.6	61	45.2	33	24.4	17	12.6	2	1.5	1	0.7	-	-	135	100
NIC II	1	4.3	7	30.4	6	26.1	6	26.1	3	13.0	-	-	-	-	23	100
NIC III	-	-	1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100

Fuente: Base de datos.
Elaboración: Los autores

Los casos más importantes se presentan entre los 25 y 34 años con un diagnóstico de inflamatorio 54.5% e Investigación de HPV 46.1%.

TABLA No. 7

Distribución numérica y porcentual de los VPH de alto riesgo. Cuenca 2008 - 2014.

	N	
16	64	26.2
18	11	4.5
31	28	11.5
33	23	9.4
35	8	3.3
39	12	4.9
45	3	1.2
51	25	10.2
52	17	7.0
56	14	5.7
58	14	5.7
59	4	1.6
66	17	7.0
68	4	1.6
Total	244	100.0

Fuente: Base de datos.
Elaboración: Los autores

El Virus del papiloma Humano más recuente es el HPV16 con el 26.2%.

TABLA No. 8

Distribución numérica y porcentual de los VPH de alto riesgo y el Diagnóstico Ginecológico. Cuenca 2008 - 2014.

VPH	GRUPOS DE EDAD															
	15 a 24		25 a 34		35 a 44		45 a 54		55 a 64		65 a 74		> 74		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
16	13	20.3	29	45.3	12	18.8	7	10.9	2	3.1	-	-	1	1.6	64	100
18	3	27.3	7	63.6	-	-	1	9.1	-	-	-	-	-	-	11	100
31	4	14.3	16	57.1	4	14.3	2	7.1	2	7.1	-	-	-	-	28	100
33	4	17.4	13	56.5	6	26.1	-	-	-	-	-	-	-	-	23	100
35	2	25.0	3	37.5	2	25.0	1	12.5	-	-	-	-	-	-	8	100
39	1	8.3	7	58.3	3	25.0	1	8.3	-	-	-	-	-	-	12	100
45	1	33.3	2	66.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	100
51	5	20.0	10	40.0	6	24.0	1	4.0	2	8.0	1	4.0	-	-	25	100
52	1	5.9	8	47.1	5	29.4	3	17.6	-	-	-	-	-	-	17	100
56	4	28.6	4	28.6	5	35.7	1	7.1	-	-	-	-	-	-	14	100
58	1	7.1	6	42.9	4	28.6	3	21.4	-	-	-	-	-	-	14	100
59	-	-	4	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	100
66	3	17.6	10	58.8	3	17.6	1	5.9	-	-	-	-	-	-	17	100
68	-	-	1	25.0	1	25.0	1	25.0	1	25	-	-	-	-	4	100

Fuente: Base de datos.
Elaboración: Los autores

El Virus del papiloma Humano más frecuente es el HPV16 con el 45.3% en el grupo etáreo comprendido entre 25-34 años.

DISCUSIÓN

La presente investigación se realizó en mujeres con edades comprendidas entre 15 y 76 años, mismas que radican en la ciudad de Cuenca Ecuador. Las investigaciones realizadas que se han podido dar en el Ecuador en su mayoría han sido efectuadas en los hospitales de SOLCA, en otros servicios de salud, muy pocos estudios se han realizado en mujeres de poblaciones abiertas y de manera aleatorizada.

1. En la tabla N° 1; sobre la prevalencia del VPH en población mujeres que participaron en el estudio, se puede apreciar que el 78.4% presentan la prueba positiva lo que representa a 392 mujeres de 500 en estudios.

Mientras que el 21.6 % representa a 108 mujeres en resultados Negativo, concluyendo que la prevalencia del VPH en las mujeres de América Latina cada año se incrementa, así lo reportan las estadísticas del ministerio de salud. Las condiciones socioeconómicas en los paises Latinos son similares, así como Chile con el (14%), Colombia (15%), Argentina (17%), y Costa Rica (16%), así como de otros continentes Europa (2.12%) y Asia (13,14%). Es muy importante recalcar lo siguiente que la población de estudio fue cautiva es decir acudían al ginecólogo ya con algún tipo de lesión, es por esto que la prevalencia pudo ser mucho mayor.

Se puede indicar que en la Tabla N° 2, sobre los genotipos más frecuentes fueron el VPH 16 seguido del 11, los datos nuestros al comparar con son distintos a otros estudios realizados en el país, posiblemente porque corresponden a otra realidad geográfica y cultural; así tenemos que, en el Hospital Metropolitano de la ciudad de Quito, el genotipo más común fue el 6 (8.8%), seguido por el 66 (4.8%) y los tipos 16, 31, 44 que alcanzan el 2.4%; en tanto que los tipos 11, 34, 35, 54, 59, 62 y 67 mostraron un porcentaje equivalente a 1.6% para cada uno, y los tipos restantes mostraron una frecuencia de 0.8%. Sí por ejemplo en Santa Elena, Guayas-Ecuador, los serotipos más frecuentemente detectados, fueron: 16, 52, 58 y 59, 62, 71, 72 y 83. En otro estudio realizado en Ecuador los genotipos más comunes fueron HPV 16 (64.5%) y VPH 81 (29%) seguido por VPH 31, 53, 56 y 58.

Nuestro grupo de Biotecnología Molecular de la Facultad de Ciencias Médicas conjuntamente con la Dirección de Investigación de la Universidad de Cuenca realizó una investigación sobre genotipos del papiloma virus humano en muestras cérvico-uterinas de 500 mujeres de la ciudad de Cuenca, donde obtuvimos estos resultados: VPH 35.9% para los genotipos de alto riesgo, 14.3% para los genotipos de bajo riesgo; 8% ASC-US, 2.6% de

lesiones intraepiteliales de bajo grado y 1.0% de lesiones intraepiteliales de alto grado (Cárdenas 2014).

CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren proporcionar las herramientas para las autoridades de salud para comprender la distribución de HPV y la necesidad de tomar medidas para reducir el impacto de la enfermedad siendo que el papiloma virus humano que es un patógeno de transmisión sexual se desarrolla de manera preferente en el sexo femenino del cantón Cuenca ya que el 78.4% de la población es portador del mismo; de lo que se desprende que de cada 10 mujeres que asisten a la consulta ginecológica 7 son portadoras del virus.

Los genotipos más frecuentes encontrados en nuestra investigación fueron el papiloma virus 16 con el 26.2%, seguido del 18 con el 4.5% que están relacionados directamente con el desarrollo de cáncer cérvico uterino ya que al correlacionar con la citología (Papanicolaou) se demuestra que la célula sufre cambios morfológicos (koilocytosis).

Dentro de las patologías ginecológicas la más frecuente solicitada por los ginecólogos es la investigación del HPV, con el 51%, seguido por la Neoplasia Intracervical grado I NIC I con el 27%, entidades clínicas ginecológicas en las cuales está presente el HPV y que en el 98% de los cánceres es el causante principal de lesiones premalignas y malignas del útero. Estos exámenes se realizan en caso de existir cambios morfológicos visualizados en el Papanicolaou con la finalidad de determinar el agente causal, sin embargo, se la realiza como pruebas de tamizaje ginecológico o predisposición genética a desarrollar cáncer cervicouterino.

RECOMENDACIONES

Motivar estudios de prevalencia, casos y controles y experimentales con otras Instituciones y así poder realizar estudios inter y multidisciplinarios (multicéntricos) en un mayor número de personas con el apoyo de las 2 universidades y de los gobiernos de los dos países.

La investigación permitió emprender un programa piloto educativo de promoción, prevención, identificación y seguimiento de las enfermedades de transmisión sexual y del cáncer de cuello uterino, en la página WEB del Ministerio de Salud y extrapolándolo a las Universidades de Tumbes y de Cuenca.

Intercambio científico, humano, tecnológico entre los dos países y las dos instituciones universitarias para potenciar no solamente los lazos de amistad sino mejorar el nivel académico y por ende la investigación.

Realizar un estudio no solamente de los genotipos del VPH sino de susceptibilidad genética de la

población a desarrollar no solamente infecciones virales sino también predisposición genética del Cáncer Cervicouterino. Analizar a los niños nacidos de madres con VPH, hacerles un seguimiento en el tiempo y ver los efectos del virus en ellos, ya que se ha relacionado al VPH con cáncer de la ringe, boca, próstata, estómago.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ¿Cuáles son los factores de riesgo del cáncer de cuello uterino? [Internet]. [citado 29 de noviembre de 2016]. Disponible en: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdecuellerino/guidadetallada/cancer-de-cuello-uterino-causes-risk-factors>.
2. LA PREVENCIÓN D. ARTÍCULO ESPECIAL. *Med B Aires*. 2013;73(6):585-596.
3. OMS | Papilomavirus humanos (PVH) y cáncer cervicouterino [Internet]. WHO. [citado 13 de diciembre de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/es/>.
4. Moro Rodríguez E, García Espinosa B, Carneros D, Álvarez Fernández E. Distribución de genotipos del virus del papiloma humano en una población de mujeres españolas no vacunadas con enfermedad de vulva y vagina. *Rev Esp Patol*. :137-44
5. Flores-Miramontes MG, Torres-Reyes LA, Aguilar-Lemarroy A, Vallejo-Ruiz V, Piña-Sánchez P, Gutiérrez EC-, et al. Prevalencia de genotipos de VPH en México y en el mundo detectados mediante Linear Array. *Rev Médica Inst Mex Seguro Soc*. 15 de mayo de 2015;53(S2):122-30.
6. Rodríguez González D, Pérez Piñero J, Sarduy Nápoles M. Infección por el virus del papiloma humano en mujeres de edad mediana y factores asociados. *Rev Cuba Obstet Ginecol*. junio de 2014;40(2):218-32.
7. Venezuela RF, Kiguen AX, Frutos MC, Cuffini CG. Circulation of human papillomavirus (HPV) genotypes in women from Córdoba, Argentina, with squamous intraepithelial lesions. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. febrero de 2012;54(1):11-6
8. Reigosa A, Fernández Á, Hung CY, Graterol I, Fernández Y, Espinal JD, et al. Genotipos del virus papiloma humano en el cuello uterino de mujeres de la región central de Venezuela. *Rev Obstet Ginecol Venezuela*. septiembre de 2015;75(3):177-86.
9. Concha P X, Urrutia S T, Riquelme H G. Creencias y virus papiloma humano. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2012;77(2):87-92.
10. Melo A, Vásquez AM, Andana A, Matamala M, Pino T, Guzmán P, et al. Genotipificación del virus papiloma humano en mujeres bajo 25 años de edad participantes del Programa Nacional del Cáncer Cérvico-uterino en la Región de la Araucanía, Chile. *Rev Chil Infectol*. octubre de 2014;31(5):542-8.
11. Trujillo E, Morales N, Buitrago O, Posso H, Bravo MM. Genotype distribution of Human Papillomavirus in women from Bogotá with abnormal cervical smear. *Rev Colomb Cancerol*. enero de 2016;20(1):3-9.
12. Bobadilla ML, Zorrilla ME, Villagra V, Olmedo G, Roscher G, Franco F, et al. Molecular detection of high oncogenic risk human papiloma virus in cervical samples. *Central Laboratory of Public Health: First results. Mem Inst Investig En Cienc Salud*. abril de 2015;13(1):17-23.
13. Bobadilla ML, Villagra V, Zorrilla ME, Pablo P, Olmedo G, Roscher G, et al. Molecular Detection of High Risk Human Papillomavirus in following women treated for squamous intraepithelial lesion. *Mem Inst Investig En Cienc Salud*. abril de 2016;14(1):64-9.
14. Núñez JA, Delfín LR, Vera MFP, Baltuano MV. Detección molecular de regiones oncogénicas e6 y e7 de virus del papiloma humano mediante pcr en pacientes papanicolaou negativo del instituto regional de enfermedades neoplásicas de la libertad. *Sciéndo [Internet]*. 11 de enero de 2016 [citado 13 de diciembre de 2016];17(2). Disponible en: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/SCIENDO/article/view/1046>.
15. OMS | Papilomavirus humanos (PVH) y cáncer cervicouterino [Internet]. WHO. [citado 29 de noviembre de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/es/>
16. Silva R, León D, Brebi P, Ili C, Roa JC, Sánchez R. Diagnóstico de la infección por virus papiloma humano en el hombre. *Rev Chil Infectol*. abril de 2013;30(2):186-92.
17. Zaldívar Lelo de Larrea G, Martín Molina F, Ferreyra S, Francisco C, Ávila Morales J, Lloret Rivas M, et al. Cáncer cervicouterino y virus del papiloma humano. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2012;77(4):315-21.
18. González-Andrade F, Sánchez D. HPV genotyping in anogenital abnormal samples of Ecuadorian women. Department of Medicine, Hospital Metropolitano, Quito, Ecuador.fabriciogonzalez@yahoo.es.2009.
19. Braz J Med Biol Res. 2009 Jul;42(7):629-36. Human papillomavirus infection and its association with cervical dysplasia in Ecuadorian women attending a...www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19578642.2009.
20. Tornesello ML, y colaboradores. A pilot study on the distribution of human papillomavirus genotypes and HPV-16 variants in cervical neoplastic lesions from Ecuadorian women. 2009.
21. Picón Gabriela, Neira Hernán, Sánchez Isabel, Campo-verde Alfredo, Cordero Leoncio, Ugalde Jorge. Detección del ADN del virus del papiloma humano mediante PCR en pacientes con citología de ASCUS; instituto del Cáncer SOLCA-Cuenca.2005-2006.Revista Oncología. Vol. 16. Cuenca. Ecuador. 2006.
22. INEC; Anuario de nacimientos y Defunciones. Ecuador. 2009.