



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**“Prevalencia de los tipos de virus del papiloma humano  
según el grado de las lesiones neoplásicas del cérvix y la  
edad: estudio transversal en mujeres referidas a  
colposcopia en el estado de San Luis Potosí, México”**

Tesis que presenta  
**Raúl de la Rosa Martínez**

Para obtener el grado de  
**Maestro en Ciencias en Biología Molecular**

Director de la Tesis:  
**Dr. Rubén López Revilla**

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2013



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis **“Prevalencia de los tipos de virus del papiloma humano según el grado de las lesiones neoplásicas del cérvix y la edad: estudio transversal en mujeres referidas a colposcopia en el estado de San Luis Potosí, México”** presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Raúl de la Rosa Martínez** y aprobada el **primer día del mes de julio del dos mil trece** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

**Dr. Rubén López Revilla**  
Director de la tesis

**Dr. Luis Antonio Salazar Olivo**  
Miembro del Comité Tutorial

**Dra. Irene Castaño Navarro**  
Miembro del Comité Tutorial



## **CRÉDITOS INSTITUCIONALES**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Rubén López Revilla.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. de registro 104390 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 107 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 1 días del mes de julio del año 2013, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Luis Antonio Salazar Olivo</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Rubén Hipólito López Revilla</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó el C.

**Raúl De la Rosa Martínez**

sobre la Tesis intitulada:

***Prevalencia de los tipos de virus del papiloma humano según el grado de las lesiones neoplásicas del cérvix y la edad: estudio transversal en mujeres referidas a colposcopia en el estado de San Luis Potosí, México***

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Rubén Hipólito López Revilla**


El Jurado, después de deliberar, determinó

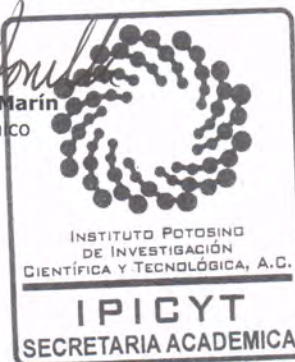
**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 14:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 1 días del mes de julio de 2013.

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



## **DEDICATORIAS**

*Con amor para mi hija Zahira*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Rubén López por su apoyo, guía y enseñanzas en la dirección de mi tesis y del proyecto.

A la Biol. Mireya Sánchez Garza por su apoyo técnico y administrativo en el laboratorio y durante el desarrollo del proyecto.

A la Secretaria de Salud por las facilidades y apoyo en la ejecución del proyecto.

A los Médicos responsables de las clínicas de colposcopia por su entusiasmo en la recolección de las muestras incluidas en este trabajo.

A los compañeros del laboratorio de Biotecnología médica y pecuaria.

# CONTENIDO

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS .....	II
CRÉDITOS INSTITUCIONALES .....	III
ACTA DE EXAMEN.....	IV
DEDICATORIAS .....	V
AGRADECIMIENTOS.....	VI
RESUMEN .....	VIII
ABSTRACT .....	IX
INTRODUCCIÓN.....	1
Infección por virus del papiloma humano y cáncer cervicouterino .....	1
Tipos de VPH-AR y lesiones neoplásicas del cérvix en la ciudades de San Luis Potosí y Guanajuato.....	2
Problema central.....	2
Objetivo 3 .....	
Estrategia.....	3
MATERIAL Y MÉTODOS.....	3
Diseño del estudio.....	3
Contexto.....	4
Participantes .....	4
Variables analizadas.....	4
Tamaño de la muestra .....	5
Raspados cervicales.....	5
Extracción y cuantificación de DNA .....	6
Detección y tipificación de VPH .....	6
Análisis estadístico.....	8
Fig. 1. Ejemplo de tipificación de VPH-AR y -BR en raspados cervicales.....	9
Fig. 2. Aseguramiento de la calidad del DNA.....	10
RESULTADOS .....	11
Características sociodemográficas y clínicas de las participantes.....	11
Prevalencia global de VPH .....	11
Prevalencias de la infección por VPH edad-específica .....	11
Fig. 3. Diagrama de flujo de los resultados.....	12
Tabla 1. Características de las mujeres según las lesiones neoplásicas por grupo de edad (N = 700).....	13
Tabla 2. Prevalencias globales y por grupo de edad de las infecciones por VPH-AR, -BR, únicas, múltiples y por tipos virales específicos (N = 700) .....	14
Fig. 4. Prevalencia general de los tipos de VPH-AR y VPH-BR.....	15
Fig. 5. Prevalencias de las infecciones por VPH (global, por VPH-AR y VPH-BR) por grupo de edad.....	16
Prevalencia de la infección por VPH según el grado de las lesiones neoplásicas.....	17
Tipos de VPH según el grado de las lesiones neoplásicas.....	18
Tabla 3. Prevalencias de VPH por grado de lesión neoplásica en las infecciones por VPH-AR, -BR, únicas y múltiples y por tipos virales específicos (N = 700) .....	20
Fig. 6. Prevalencias de las infecciones por VPH (global, por VPH-AR y VPH-BR) en lesiones neoplásicas de grado creciente .....	21
Fig. 7. Prevalencia de las infecciones por VPH únicas y múltiples en lesiones neoplásicas de grado creciente .....	22
Fig. 8. Prevalencia de los tipos de VPH-AR y BR en LBG, LAG y CaCu .....	23
Fig. 9. Distribución de los casos de lesiones neoplásicas e infección por VPH por grupo de edad.....	24
DISCUSIÓN.....	25
REFERENCIAS .....	28

## RESUMEN

### **PREVALENCIA DE LOS TIPOS DE VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO SEGÚN EL GRADO DE LAS LESIONES NEOPLÁSICAS DEL CÉRVIX Y LA EDAD: ESTUDIO TRANSVERSAL EN MUJERES REFERIDAS A COLPOSCOPIA EN EL ESTADO DE SAN LUIS POTOSÍ, MÉXICO**

**ANTECEDENTES.** La prevalencia de los tipos de virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) y de bajo riesgo (VPH-BR) que infectan el cérvix de las mujeres tamizadas para el cáncer de cérvix (CaCu) en el estado de San Luis Potosí es desconocida.

**OBJETIVO.** Realizar un estudio transversal para conocer la prevalencia de los tipos de VPH-AR y -BR entre las mujeres atendidas en las clínicas de colposcopia del estado de San Luis Potosí y su relación con el grado de las lesiones neoplásicas y la edad.

**MÉTODOS.** Para identificar 13 tipos de VPH-AR y seis de VPH-BR en raspados cervicales empleamos PCR multiplex anidada del gen E6 (Sotlar et al. J Clin Microbiol 42: 3176-3184, 2004). Los diagnósticos de citología cervical fueron: Sin lesión, Atipia de células escamosas de grado indeterminado (ASCUS), Lesión neoplásica intraepitelial de bajo grado (LBG), Lesión neoplásica intraepitelial de alto grado (LAG) o cáncer (CaCu).

**RESULTADOS.** Fueron incluidas 700 mujeres con edad media  $\pm$  DE =  $37.4 \pm 12.0$  años. Las prevalencias de VPH fueron: global 67.7%, VPH-AR 63.1% y VPH-BR 21.3%. Las infecciones únicas y múltiples tuvieron prevalencias similares, 35.1% y 32.4% respectivamente. Los tipos de VPH-AR más prevalentes fueron VPH-33 (33.1%), -16 (16.6%) y -18 = -51 (6.7%) y los de VPH-BR fueron VPH-6/11 (8.3%), -43 (7.9%) y -66 (5.3%). Las prevalencias de VPH fueron más altas en los grupos de 15-24 años (78.2%) y  $\geq 55$  años (69.1%). La asociación de infección por VPH con el grado de las lesiones fue significativa ( $P = 0.0001$ ): Sin lesión 29.6%, ASCUS 53.3%, LBG 67.7%, LAG 72.3% y CaCu 90.5%.

**CONCLUSIONES.** La prevalencia global de VPH (67.6%) es casi seis veces mayor que la encontrada en estudios de población abierta (10%-14%). La infección de VPH aumenta con la progresión neoplásica. Casi la mitad de las mujeres tienen infecciones por tipos virales múltiples. Los tipos de VPH-AR más prevalentes (VPH-33, -16 y -18 = -58) contrastan con el orden de su prevalencia mundial (VPH-16, -18, -31). La tendencia de la prevalencia VPH-edad específica tiene una forma de U poco pronunciada.

**PALABRAS CLAVE:** Cáncer de cérvix, Virus del papiloma humano, VPH de alto riesgo, VPH de bajo riesgo, Lesiones neoplásicas, Tamizaje del cáncer cervicouterino.



## ABSTRACT

### PREVALENCE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPES VERSUS GRADE OF CERVICAL NEOPLASTIC LESIONS AND AGE: CROSS-SECTIONAL STUDY IN WOMEN REFERRED TO COLPOSCOPY IN THE STATE OF SAN LUIS POTOSI, MEXICO

**BACKGROUND.** The prevalence of human papillomavirus of high risk (HR-HPV) and low risk (LR-HPV) types infecting the cervix of women screened for cervical cancer (CC) in the state of San Luis Potosi is unknown.

**AIM.** To determine the prevalence of HR- and LR-HPV types in a cross-sectional study of women attending colposcopy clinics in the state of San Luis Potosi, and their association with the degree of neoplastic lesions and age.

**METHODS.** Thirteen HR-HPV and six LR-HPV types can be identified in cervical scrapes by nested multiplex PCR of the E6 gene (Sotlar et al. J Clin Microbiol 42: 3176-3184, 2004). Cervical cytology diagnoses were: Normal, Atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS), Low-grade grade squamous intraepithelial lesions (LSIL), High-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) or cancer (CC).

**RESULTS.** Seven-hundred women with a mean age  $\pm$  SD = 37.4  $\pm$  12.0 years were included. The HPV prevalences found were: overall 67.8%, HR-HPV 63.1% and LR-HPV 21.3%. Single-type infections had a similar prevalence (35.1%) than multiple-type infections (32.4%). The most prevalent types were, for HR-HPV: HPV-33 (33.1%), -16 (16.6%) = -51 and -18 (6.7%); and for HPV-BR: VPH-6/11 (8.3%) -43 (7.9%) and -66 (5.3%). HPV prevalence was highest in the 15-24 years group (78.2%) followed by the  $\geq$ 55 years group (69.1%). Association of HPV infection with neoplastic progression was significant ( $P = 0.0001$ ): 29.6%-normal cytology, 53.3%-ASCUS, 67.7%-LSIL, 72.3%-HSIL and 90.5%-CC.

**CONCLUSIONS.** Overall prevalence of cervical HPV infection in the women studied (67.6%) is nearly six times higher than that found in general population studies (10%-14%). As expected, HPV infection increases with neoplastic progression. Almost half of the women had multiple-type HPV cervical infections. The most prevalent HR-HPV types found (HPV-33, -16 and -18 = -58) contrast with the global prevalence order (HPV-16, -18, -31). The trend of age-specific HPV prevalence had, as expected, a slightly pronounced U-shape.

**KEYWORDS.** Cervical cancer, human papillomavirus, high-risk HPV, low-risk HPV, Neoplastic lesions, Screening for cervical cancer.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Infección por virus del papiloma humano y cáncer cervicouterino**

Los virus del papiloma humano (VPH) son los agentes de transmisión sexual más comunes en el mundo (Burchell et al. 2006). La infección persistente del cérvix por estos virus provoca lesiones neoplásicas precursoras ('precancerosas') que en la mayoría de los casos curan espontáneamente pero en el resto de los casos pueden progresar hasta el cáncer de cérvix (CaCu) (Moscicki et al. 2006, Walboomers et al. 1999, zur Hausen 1996).

Existen más de 100 tipos de VPH, de los cuales unos 40 infectan el área anogenital (de Villiers et al. 2004). Los tipos causantes de CaCu se clasifican como oncogénicos o 'de alto riesgo' (VPH-AR) y los causantes de tumores anogenitales benignos (condilomas y verrugas) como 'de bajo riesgo' (VPH-BR). Los 13 tipos principales de VPH-AR son VPH-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59 y -68 y los cinco tipos principales de VPH-BR son VPH-6, -11, -42, -43, -44 (Munoz et al. 2003).

Entre los tipos de alto riesgo, VPH-16 y -18 causan el 70% de los casos de CaCu en el mundo (Clifford et al. 2003b), en tanto que entre los de bajo riesgo VPH-6 y -11 causan el 95% de los casos de verrugas anogenitales (Lacey et al. 2006).

La infección persistente por algún tipo de VPH-AR conduce a la proliferación clonal de las células epiteliales del cérvix infectadas, que pueden progresar para dar lesiones neoplásicas precursoras y CaCu (Moscicki et al. 2006).

En 2008 se estimaron 529,000 casos nuevos y 275,000 muertes por CaCu en el mundo siendo esta enfermedad la tercera causa de muerte por cáncer entre las mujeres. Sin embargo, en los países en vías de desarrollo el CaCu es la segunda causa de muerte y en ellos ocurren el 88% de las muertes del mundo (Ferlay et al. 2010).

A partir de 2006 el CaCu en México ocupa la segunda posición con respecto a muertes por cáncer después del cáncer de mama como primer lugar. En 2008 se registraron 4031 defunciones y la tasa de mortalidad ajustada fue de 9.7 por cada 100,000 mujeres la cual sigue siendo alta en comparación con la tasa de mortalidad de los países desarrollados que es de 3.1 por 100,000 mujeres. En San Luis Potosí las muertes por CaCu son casi 100 por año (de 2000 hasta 2008) por lo que la tasa de mortalidad es alta y similar a la nacional de 9.3 / 100,000 mujeres (Ferlay et al. 2010, SSA 2008).

### **Tipos de VPH-AR y lesiones neoplásicas del cérvix en la ciudades de San Luis Potosí y Guanajuato**

La prevalencia de siete tipos de VPH-AR en los raspados del cérvix fue determinada por nuestro grupo en 280 mujeres de la ciudad de San Luis Potosí y 192 mujeres de tres ciudades de Guanajuato mediante análisis de los fragmentos de restricción de productos de PCR del gen E6 (PCR-RFLP) (Lopez-Revilla et al. 2008). Tuvieron lesiones de bajo grado (LBG) el 73%, de alto grado (LAG) el 17% y de CaCu el 10% de estas mujeres.

La prevalencia, en orden descendente, de los tipos de VPH-AR identificados en ese estudio: VPH-16 (53.4%), -31 (15.6%), -18 (8.9%), -35(5.6%), -52 (5.4%), -33 (1.2%) y 58 (0.7%), resultó diferente a la prevalencia mundial descrita para VPH-16, -18 y -31 (Lopez-Revilla et al. 2008).

### **Problema central**

Es esencial conocer la prevalencia global de la infección por VPH y de los tipos de -AR y -BR entre las mujeres residentes en cada región geográfica. Como el tamizaje oportuno de las lesiones neoplásicas del cérvix está basado en la historia natural de la infección por VPH y el CaCu, la detección de la infección por tipos de VPH-AR y -BR según la edad y el grado de las lesiones ayudaría a mejorar la detección oportuna y el control del CaCu en cada región. Además permitiría conocer los nichos de los tipos de VPH-AR más frecuentes en cada grupo de lesiones neoplásicas de grado creciente y determinar cuáles serían las vacunas

profilácticas tipo-específicas más eficaces para prevenir la infección y el CaCu en una región y época dada.

El estudio de estas variables entre las mujeres atendidas en las clínicas de colposcopia del estado de San Luis Potosí permitiría 1) determinar los tipos virales circulantes para comparar los resultados con el estudio previo (que estuvo limitado a siete tipos de VPH-AR) y conocer la prevalencia de la infección por tipos de VPH-BR, 2) apoyar la vigilancia epidemiológica y la detección oportuna del CaCu, y 3) sentar las bases para evaluar los efectos futuros de las vacunas profilácticas sobre la prevalencia de los tipos de VPH circulantes.

## **Objetivo**

Identificar los tipos de VPH-AR y -BR que infectan el cérvix de las mujeres atendidas en las clínicas de colposcopia del estado de San Luis Potosí para determinar su prevalencia y su relación con el grado de las lesiones neoplásicas y la edad de las mujeres infectadas.

## **Estrategia**

Identificar los tipos de VPH en los raspados cervicales de mujeres atendidas en las clínicas de colposcopia (con expedientes completos, diagnóstico de citología o histopatología cervical o ambos) con un método molecular sensible y de amplio espectro y correlacionar la prevalencia de los tipos virales con el grado de las lesiones neoplásicas y la edad de las mujeres.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

## **Diseño del estudio**

Se trata de un estudio transversal realizado entre junio de 2007 y noviembre de 2009, en 837 mujeres de 15 a 85 años de edad residentes en el estado de San Luis Potosí y atendidas en las clínicas de colposcopia de la Secretaría de Salud estatal. El estudio fue aprobado por el comité de ética e investigación y apoyado

por los Servicios de Salud del estado y todas las participantes dieron su consentimiento informado.

## **Contexto**

El reclutamiento y la toma de los raspados cervicales fueron realizados simultáneamente durante las consultas para la atención de las participantes en las cinco clínicas de colposcopia de los Servicios de Salud ubicadas en cinco establecimientos: 1) Centro de Salud 'Dr. Juan H. Sánchez' de la ciudad de San Luis Potosí, 2) Hospital General de Matehuala, 3) Hospital General de Rioverde, 4) Hospital General de Ciudad Valles y 5) Hospital Comunitario de Tamazunchale. Los datos sociodemográficos y clínicos fueron obtenidos entre junio de 2007 y agosto de 2010 debido al retraso en la entrega de los expedientes completos y de los resultados de histopatología a los responsables de las clínicas.

## **Participantes**

Los criterios de inclusión fueron contar con datos sociodemográficos completos e historia clínica dirigida y diagnóstico de citología cervical previo a la colposcopia. Los criterios de exclusión fueron el expediente clínico incompleto o ausente, condiciones inadecuadas para la toma del raspado cervical (embarazo, menstruación), o negativa de las mujeres invitadas a participar en el estudio.

## **Variables analizadas**

La historia clínica dirigida fue obtenida con un instrumento cuyos datos fueron llenados a través de revisión del expediente clínico de cada participante.

Las variables analizadas incluyeron la edad de las participantes al momento del raspado y el diagnóstico de citología cervical con la nomenclatura del Sistema Bethesda 2001. Los diagnósticos citológicos fueron: 1) Sin lesión o Citología normal, 2) Atipia de células escamosas de significado indeterminado (ASCUS), 3) Lesión intraepitelial de bajo grado (LBG), 4) Lesión intraepitelial de alto grado (LAG) y 5) Cáncer del cérvix (CaCu).

Los diagnósticos 'Sin lesión' o 'Citología normal' correspondieron a mujeres en seguimiento o tratadas durante la visita para colposcopia. Los diagnósticos 'LAG' y 'CaCu' fueron confirmados por análisis histopatológico de las biopsias.

Las infecciones por tipos de VPH-AR y -BR ('variable de exposición') fueron determinadas a partir del DNA aislado de los raspados cervicales y relacionadas con el grado de las lesiones neoplásicas y la edad ('variables de resultado').

### **Tamaño de la muestra**

A partir de los 1080 casos de mujeres con lesiones neoplásicas (LBG y LAG) y CaCu registrados durante 2006 por la Secretaría de Salud del estado de San Luis Potosí se calculó el tamaño de la muestra aleatoria (SSA 2006a, 2006b, 2006c). El tamaño de la muestra requerida fue de 682 mujeres considerando que 1) la prevalencia de la infección por VPH se desconoce en las mujeres referidas a colposcopia y suponiendo un resultado anticipado de infección del 50%, 2) un nivel de confianza del 99% y 3) un porcentaje de error (precisión) del 3%.

### **Raspados cervicales**

A los encargados de las clínicas se les entregó el siguiente material para la toma del raspado cervical de cada participante: 1) cepillo para raspado cervical (*cytobrush*), 2) tubos de polipropileno de 5 mL con tapa rosca (Nalgene cryoware, Nalge Nunc, Rochester, NY) que contenían 2 mL de solución para el transporte y fijación de la muestra (1 mL de solución salina amortiguada con fosfatos suplementada con etiléndiamino-tetraacetato (EDTA) disódico: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>HPO<sub>2</sub> 2 mM, EDTA 25 mM, pH 7.4 y 1 mL de etanol de 96°.

Los raspados fueron colectados en el tubo de transporte y almacenados a 4°C en las clínicas, transportados en hieleras y mantenidos en el laboratorio a 4°C hasta la extracción del DNA (Lopez-Revilla et al. 2008).

## **Extracción y cuantificación de DNA**

El DNA de las muestras fijadas fue extraído mediante digestión con proteinasa K en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS), seguida de precipitación con isopropanol (Lopez-Revilla et al. 2008).

La muestra fijada fue trasvasada a un tubo nuevo de microcentrífuga de 2 mL y centrifugada a 13,000 rpm (16,250×g) por 5 min en una centrífuga Hettich Mikro 20 (Hettich, Colonia, Alemania). El sobrenadante fue descartado por decantación y a la pastilla se añadieron 500 µl de TES (Tris-HCl 10 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 2 mM, NaCl 0.4 M, pH 8.0), 50 µl de SDS al 10% y 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Las mezclas fueron incubadas 3 h a 56°C en un termoblock para disolver la muestra y digerir las proteínas. Al terminar la incubación se añadieron 151 µl de NaCl 5 M y la mezcla se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min. El sobrenadante fue aspirado cuidadosamente y pasado a un tubo nuevo al que se añadieron 577 µl de isopropanol frío (-20°C), y se dejó reposar 10 min a 4°C para precipitar el DNA. El tubo fue centrifugado a 13,000 rpm por 10 min y el sobrenadante descartado por decantación (Lopez-Revilla et al. 2008).

La pastilla de DNA fue lavada dos veces con 1 ml de etanol al 70% frío (-20°C) y centrifugada 1 min a 10,000 rpm (9,615×g). El etanol sobrenadante fue descartado cuidadosamente por decantación y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente por 15 min con el tubo invertido sobre una toalla de papel. La pastilla de DNA fue disuelta con 50 o 100 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) según la masa y 2 µL fueron analizados en el Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, VT) para determinar la pureza y concentración del DNA mediante la determinación de su densidad óptica a 260 y 280 nm.

## **Detección y tipificación de VPH**

Empleamos el método de PCR múltiplex anidada (PCRMA) del gen E6 de VPH-AR y -BR (Sotlar et al. 2004) en mezclas de 25 µL. La genotipificación se basa en el tamaño de los amplicones de los tipos de VPH identificables; el método no distingue los tipos 6 y 11 pues sus amplicones son del mismo tamaño (Sotlar et al.

2004). Las mezclas iniciales de PCR contenían los oligonucleótidos consenso GP E6/E7 para amplificar un producto del gen E6 de ~630 pb. La PCR anidada se lleva a cabo en cuatro mezclas separadas que contenían los productos de la reacción inicial y cocteles de oligonucleótidos anidados tipo-específicos. Para evitar la contaminación, los materiales desechables se usan sólo una vez y las alícuotas de cada reactivo se mantienen separadas.

Las mezclas de PCR anidada contenían un total de 18 parejas de oligonucleótidos específicos para 13 tipos de VPH-AR (VPH-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59 y -68) y seis tipos de VPH-BR (VPH-6/11, -42, -43, -44 y -66). Dos líneas celulares humanas —aisladas de sendos casos de CaCu— SiHa (transformada por VPH-16) y HeLa (transformada por VPH-18) y el plásmido pVPH33 fueron usados como controles positivos. Mezclas sin DNA fueron usadas como controles negativos (Fig. 1).

Las mezclas con oligonucleótidos consenso GPE6/E7 contenían buffer de PCR (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8.3), dNTPs 200 µM (cada uno de los cuatro desoxinucleótidos) (Invitrogen, CA, USA), MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, oligonucleótidos 0.3 µM (cada pareja) y 1 unidad de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, CA, USA). Las mezclas con oligonucleótidos VPH-tipo-específicos contenían buffer de PCR (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8.3), dNTP 152 µM (cada uno de los cuatro desoxinucleótidos) (Invitrogen, CA, USA), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, oligonucleótidos 0.3 µM (cada pareja) y 1 unidad de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, CA, USA). Las mezclas de PCR para β-globina tenían los mismos componentes que las de oligonucleótidos VPH tipo-específicos excepto por los oligonucleótidos PC04/GH20 (Saiki et al. 1988). La calidad del DNA en los casos VPH-negativos fue evaluada en mezclas de PCR para amplificar el fragmento de 260 pb del gen de β-globina humana (Fig. 2).

Las condiciones de termociclado fueron las siguientes. En las mezclas con oligonucleótidos consenso: desnaturalización inicial a 94°C por 4 min; 40 ciclos a 94°C por 1 min, 40°C por 1 min y 72°C por 2 min y extensión final a 72°C por 10 min. En las mezclas con oligonucleótidos VPH tipo-específicos: desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min; 35 ciclos a 94°C por 30 s, 56°C por 30 s, 72°C por 45 s y

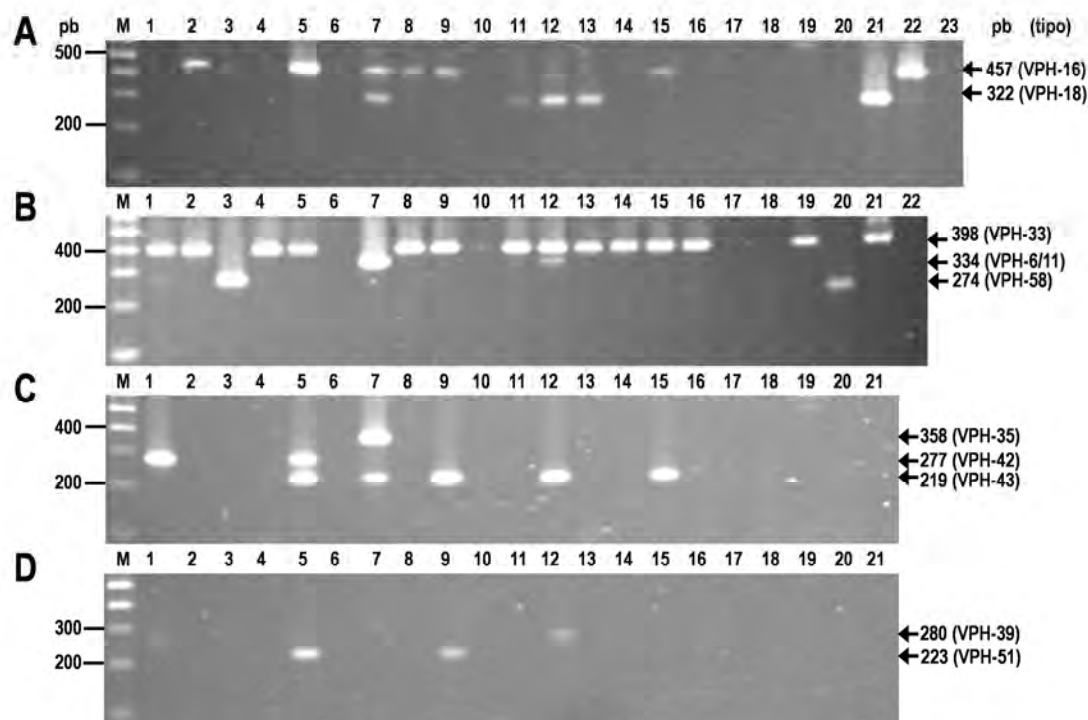


extensión final a 72°C por 4 min. En las mezclas para  $\beta$ -globina empleamos las mismas condiciones que con oligonucleótidos VPH tipo-específicos.

Cinco- $\mu$ L de las mezclas de PCRMA o  $\beta$ -globina fueron empleados para el análisis electroforético en geles de SB-agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio y visualizados por transiluminación ultravioleta en el fodocumentador Gel-Chemidoc (BioRad, CA, USA) (Fig. 1 y 2).

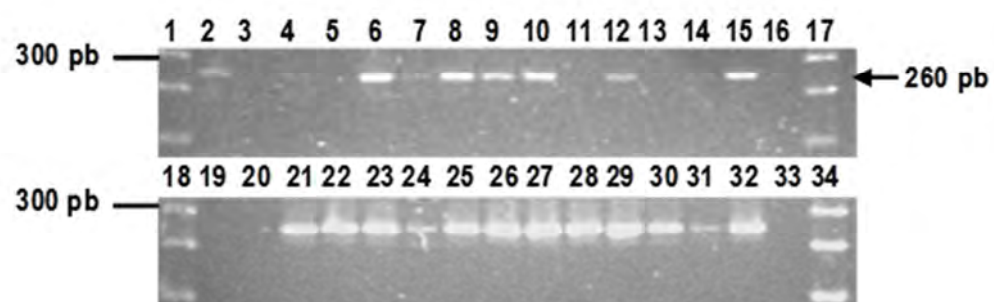
### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico fue realizado con el programa Epi Info 7. La edad como variable continua fue expresada como media y desviación estándar (DE) y recodificada como variable categórica (15-24, 25-34, 35-44, 45-54 y  $\geq 55$  años). La variable categórica ordinal del grado de lesión neoplásica fue descrita en medidas absolutas y proporciones. Las prevalencias globales de VPH expresadas por categoría de infección única o múltiple fueron calculadas con intervalos de confianza del 95%. Los datos de las infecciones por VPH fueron estratificados según el grado de las lesiones neoplásicas y el grupo de edad y las prevalencias de VPH también fueron calculadas con intervalos de confianza del 95%. La prueba de  $\chi^2$  para el análisis de tendencias se usó para determinar la asociación entre la infección por VPH global y el grado de las lesiones neoplásicas; los valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.



**Fig. 1. Ejemplo de tipificación de VPH-AR y -BR en raspados cervicales**

Tipos de VPH identificados con el método de PCRMA. Coctel 1: VPH-16, -18, -31, -59 y -45. Coctel 2: VPH-33, -6/11, -58, -52 y -56. Coctel 3: VPH-35, -42, -43, -44; Coctel 4: VPH-68, -39, -51, -66. Los geles A, B, C y D corresponden a los cocteles con los oligonucleótidos 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Carril 1, escalera de 100 pb. Carriles 2-20, muestras problema. Coctel 1, Carriles 21 y 22: Controles positivos, DNA de SiHa (VPH-16) y HeLa (VPH-18). Coctel 2, Carril 22: Control positivo de pVPH33. Control Negativo (Sin ADN): Coctel 1, Carril 22; Coctel 2, Carril 22; Cocteles 3 y 4, Carril 22. En cada gel se observan diversos amplicones específicos para los tipos de VPH-AR (e.g. -16, -18, -33, -58, -35, -39 y -51) y -BR (-6/11, -42 y -43) identificables en las mezclas con cada coctel de oligonucleótidos. Carril 5, muestra con infección quintuple por VPH-16, -33, -42, -43, -51.



**Fig. 2. Aseguramiento de la calidad del DNA**

Las bandas de 268 pb del gen  $\beta$ -globina amplificadas con los oligonucleótidos PC04/GH20 aseguran la calidad del DNA de las muestras VPH-negativas.

## RESULTADOS

### Características sociodemográficas y clínicas de las participantes

Entre las mujeres referidas a colposcopia que habían sido tamizadas previamente para la detección de CaCu, 837 fueron evaluadas para el reclutamiento. De éstas, 137 fueron excluidas por las siguientes razones: 70 por falta de expediente, 31 por carecer de identificación los raspados cervicales y 36 por calidad inadecuada del DNA (Fig. 3).

Así fueron reclutadas 700 mujeres de 15 a 82 años (media  $\pm$  DE = 37.4  $\pm$  12.0 años). Las características de las mujeres reclutadas respecto al grado de las lesiones neoplásicas y la edad se resumen en la Tabla 1. Fueron diagnosticadas LBG en 489 mujeres (69.9%), LAG en 148 (21.1%), CaCu en 21 (3.0%), ASCUS en 15 (2.1%) y ausencia de lesiones en 27 (3.9%).

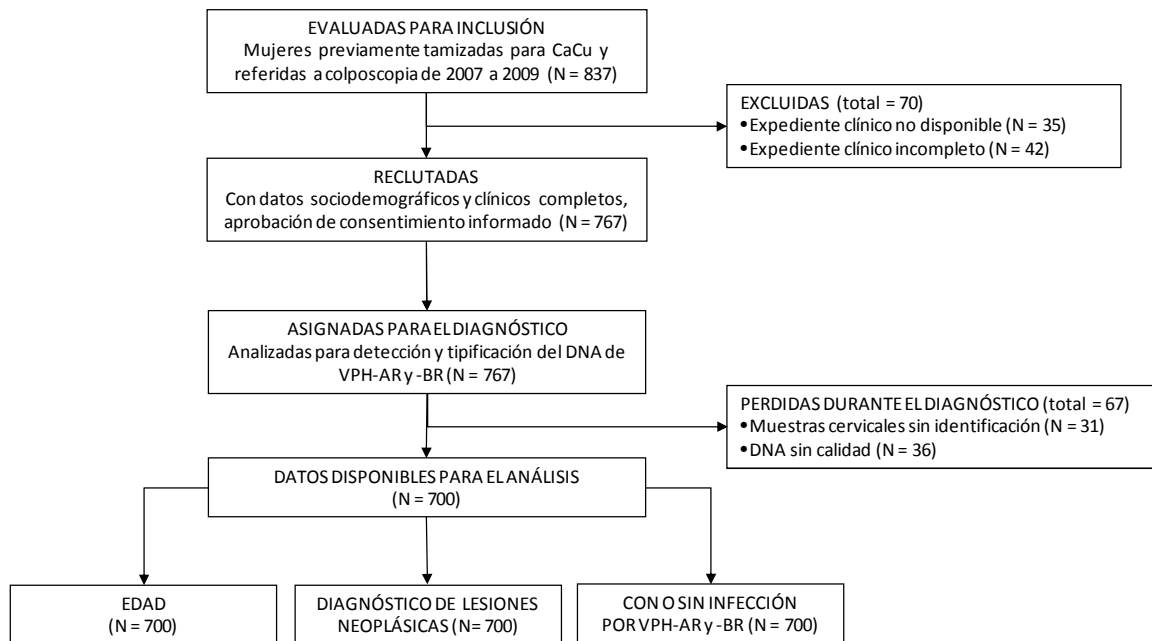
### Prevalencia global de VPH

La prevalencia global de infección por VPH entre las 700 participantes incluidas fue 67.6%. Las infecciones únicas fueron detectadas en el 35.1% y las infecciones múltiples en el 32.4% de los casos. Los tipos de VPH-AR prevalecieron en el 63.1% y los de VPH-BR en el 21.3% de los casos (Tabla 2).

Los cuatro tipos principales de VPH-AR (i.e., los más prevalentes) fueron, en orden descendente, VPH-33 (33.1%), -16 (16.6%) y -18 = -51 (6.7%); la prevalencia de los principales tipos de VPH-BR fue VPH-6/11 (8.3%), -43 (7.9%) y -66 (5.3%), como puede verse en la Fig. 4.

### Prevalencias de la infección por VPH edad-específica

La máxima prevalencia de infección por VPH (78.2%) fue observada en el grupo de 15 a 24 años y disminuyó a 67.4% y 62.8% en los grupos de 25 a 34 y de 35 a 44 años, respectivamente. Un ligero aumento en la prevalencia se observó en el grupo de 45 a 54 años hasta llegar a un segundo pico de 69.1% entre las mujeres de 55 o más años (Fig. 5).



**Fig. 3. Diagrama de flujo de los resultados**

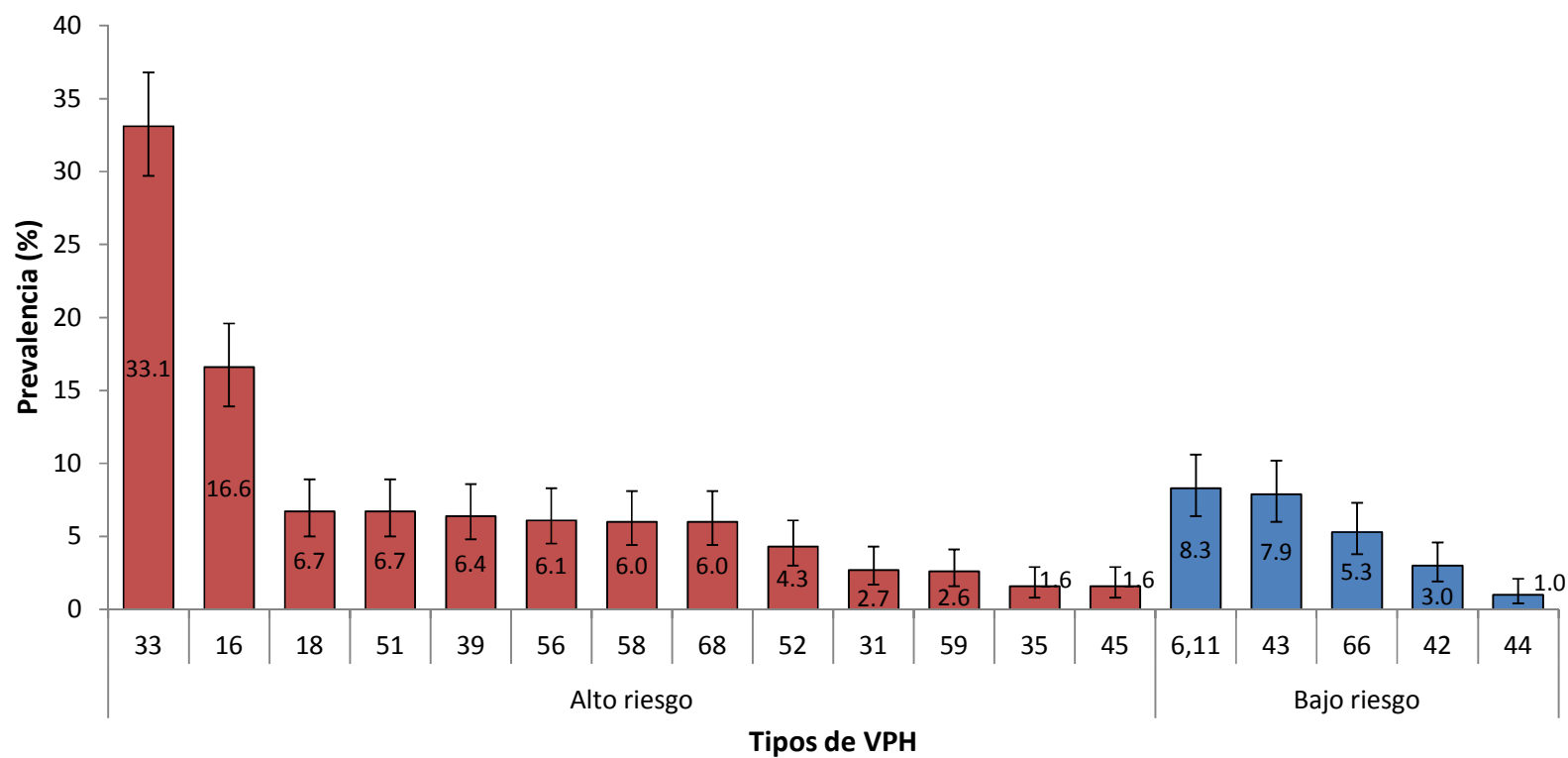
**Tabla 1. Características de las mujeres según las lesiones neoplásicas por grupo de edad (N = 700)**

	Lesiones neoplásicas					Total
	Sin lesión	ASCUS	LBG	LAG	Cáncer	
Población N, (%)	27 (3.9)	15 (2.1)	489 (69.9)	148 (21.1)	21 (3.0)	700 (100.0)
Media de la edad (DE)	40.8 ( $\pm$ 11.5)	38.9 ( $\pm$ 11.0)	35.9 ( $\pm$ 11.4)	40.6 ( $\pm$ 12.8)	45.9 ( $\pm$ 12.9)	37.4 ( $\pm$ 12.0)
Distribución por edad N, (%)						
15 - 24	1 (3.7)	1 (6.7)	81 (16.6)	17 (11.5)	1 (4.8)	101 (14.4)
25 - 34	8 (29.6)	5 (33.3)	162 (33.1)	36 (24.3)	4 (19.0)	215 (30.7)
35 - 44	8 (29.6)	5 (33.3)	140 (28.6)	41 (27.7)	5 (23.8)	199 (28.4)
45 - 54	6 (22.2)	2 (13.3)	71 (14.5)	33 (22.3)	5 (23.8)	117 (16.7)
$\geq$ 55	4 (14.8)	2 (13.3)	35 (7.2)	21 (14.2)	6 (28.6)	68 (9.7)

**Tabla 2. Prevalencias globales y por grupo de edad de las infecciones por VPH-AR, -BR, únicas, múltiples y por tipos virales específicos (N = 700)**

Categoría de infección y tipos virales	Prevalencia por grupos de edad											
	Prevalencia global (N = 700)		15-24 (N = 101)		25-34 (N = 215)		35-44 (N = 199)		45-54 (N = 117)		≥ 55 (N = 68)	
	n	% (IC 95%)	n	% (IC 95%)	n	% (IC 95%)	n	% (IC 95%)	n	% (IC 95%)	n	% (IC 95%)
<b>Totales</b>	473	67.6 (63.9-71.0)	79	78.2 (68.9-85.8)	145	67.4 (60.7-73.7)	125	62.8 (55.7-69.5)	77	65.8 (56.5-74.3)	47	69.1 (56.7-79.8)
<b>Tipos de VPH-AR</b>	442	63.1 (59.4-66.7)	73	72.3 (62.5-80.7)	141	65.6 (58.8-71.9)	118	59.3 (52.1-66.2)	70	59.8 (50.4-68.8)	40	58.8 (46.2-70.6)
16	116	16.6 (13.9-19.6)	21	20.8 (13.4-30.0)	35	16.3 (11.6-21.9)	36	18.1 (13.0-24.2)	10	8.5 (4.2-15.2)	14	20.6 (11.7-32.1)
18	47	6.7 (5.0-8.9)	7	6.9 (2.8-13.8)	15	7.0 (4.0-11.2)	11	5.5 (2.8-9.7)	10	8.5 (4.2-15.2)	4	5.9 (1.6-14.4)
31	19	2.7 (1.7-4.3)	1	1.0 (0.0-5.4)	7	3.3 (1.3-6.6)	5	2.5 (0.8-5.8)	4	3.4 (0.9-8.5)	2	2.9 (0.4-10.2)
33	232	33.1 (29.7-36.8)	36	35.6 (26.4-45.8)	76	35.3 (29.0-42.1)	57	28.6 (22.5-35.5)	45	38.5 (29.6-47.9)	18	26.5 (16.5-38.6)
35	11	1.6 (0.8-2.9)	1	1.0 (0.0-5.4)	6	2.8 (1.0-6.0)	2	1.0 (0.1-3.6)	2	1.7 (0.2-6.0)	0	0.0 (0.0-0.0)
39	45	6.4 (4.8-8.6)	4	4.0 (1.1-9.8)	18	8.4 (5.0-12.9)	10	5.0 (2.4-9.0)	9	7.7 (3.6-14.1)	4	5.9 (1.6-14.4)
45	11	1.6 (0.8-2.9)	2	2.0 (0.2-7.0)	4	1.9 (0.5-4.7)	3	1.5 (0.3-4.3)	0	0.0 (0.0-0.0)	2	2.9 (0.4-10.2)
51	47	6.7 (5.0-8.9)	8	7.9 (3.5-15.0)	21	9.8 (6.1-14.5)	8	4.0 (1.8-7.8)	8	6.8 (3.0-13.0)	2	2.9 (0.4-10.2)
52	30	4.3 (3.0-6.1)	5	5.0 (1.6-11.2)	6	2.8 (1.0-6.0)	12	6.0 (3.2-10.3)	4	3.4 (0.9-8.5)	3	4.4 (0.9-12.4)
56	43	6.1 (4.5-8.3)	12	11.9 (6.3-19.8)	12	5.6 (2.9-9.5)	9	4.5 (2.1-8.4)	4	3.4 (0.9-8.5)	6	8.8 (3.3-18.2)
58	42	6.0 (4.4-8.1)	6	5.9 (2.2-12.5)	14	6.5 (3.6-10.7)	11	5.5 (2.8-9.7)	7	6.0 (2.4-11.9)	4	5.9 (1.6-14.4)
59	18	2.6 (1.6-4.1)	2	2.0 (0.2-7.0)	6	2.8 (1.0-6.0)	7	3.5 (1.4-7.1)	2	1.7 (0.2-6.0)	1	1.5 (0.0-7.9)
68	42	6.0 (4.4-8.1)	7	6.9 (2.8-13.8)	12	5.6 (2.9-9.5)	11	5.5 (2.8-9.7)	4	3.4 (0.9-8.5)	8	11.8 (5.2-21.9)
<b>Tipos de VPH-BR</b>	149	21.3 (18.3-24.5)	30	29.7 (21-39.6)	46	21.4 (16.1-27.5)	43	21.6 (16.1-28)	17	14.5 (8.7-22.2)	13	19.1 (10.6-30.5)
42	21	3.0 (1.9-4.6)	5	5.0 (1.6-11.2)	9	4.2 (1.9-7.8)	5	2.5 (0.8-5.8)	1	0.9 (0.0-4.7)	1	1.5 (0.0-7.9)
43	55	7.9 (6.0-10.2)	15	14.9 (8.6-23.3)	16	7.4 (4.3-11.8)	12	6.0 (3.2-10.3)	6	5.1 (1.9-10.8)	6	8.8 (3.3-18.2)
44	7	1.0 (0.4-2.1)	1	1.0 (0.0-5.4)	2	0.9 (0.1-3.3)	2	1.0 (0.1-3.6)	0	0.0 (0.0-0.0)	2	2.9 (0.4-10.2)
6, 11	58	8.3 (6.4-10.6)	10	9.9 (4.9-17.5)	18	8.4 (5.0-12.9)	17	8.5 (5.1-13.3)	9	7.7 (3.6-14.1)	4	5.9 (1.6-14.4)
66	37	5.3 (3.8-7.3)	8	7.9 (3.5-15.0)	11	5.1 (2.6-9.0)	12	6.0 (3.2-10.3)	4	3.4 (0.9-8.5)	2	2.9 (0.4-10.2)
<b>Únicas</b>	246	35.1 (31.6-38.8)	41	40.6 (30.9-50.8)	65	30.2 (24.2-36.8)	65	32.7 (26.2-39.7)	50	42.7 (33.6-52.2)	25	36.8 (25.4-49.3)
<b>Múltiples</b>	227	32.4 (29.0-36.1)	38	37.6 (28.2-47.8)	80	37.2 (30.7-44.0)	60	30.2 (23.9-37.0)	27	23.1 (15.8-31.8)	22	32.4 (21.5-44.8)

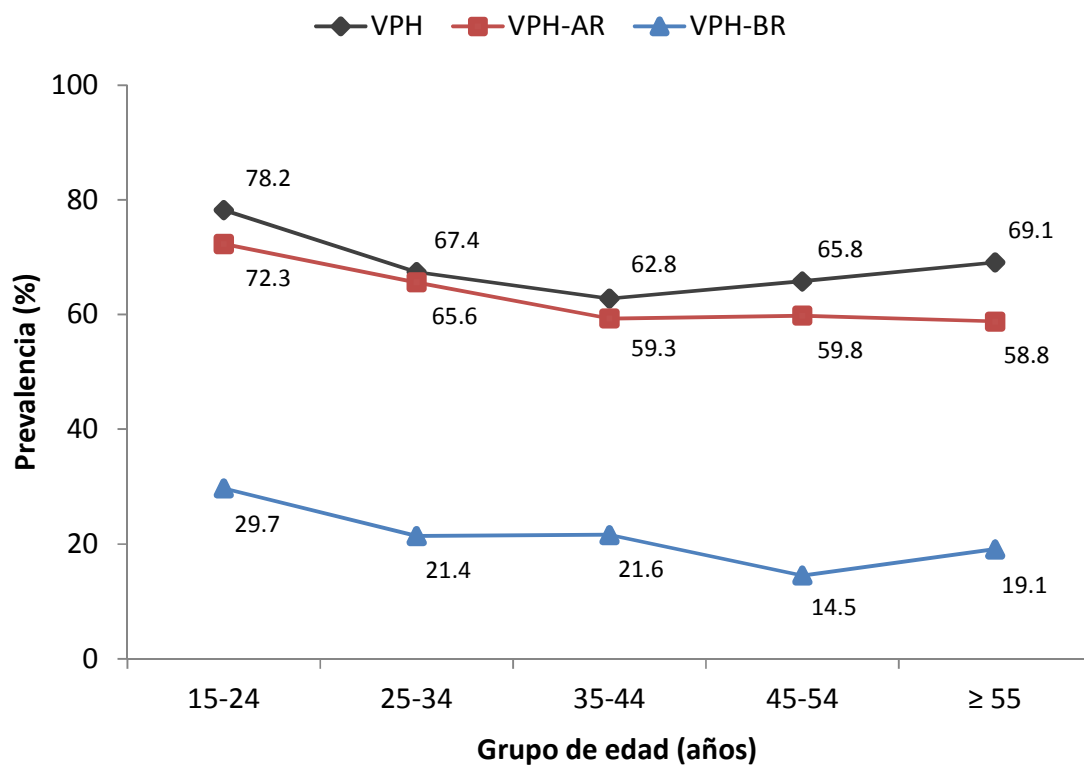
La prevalencia individual de cada tipo incluye las infecciones únicas y múltiples. IC significa intervalo de confianza.



**Fig. 4. Prevalencia general de los tipos de VPH-AR y VPH-BR**

Los tipos de VPH-AR (barras rojas) y VPH-BR (barras azules) están colocados en orden descendente de prevalencia. Las barras indican el intervalo de confianza del 95%.





**Fig. 5. Prevalencias de las infecciones por VPH (global, por VPH-AR y VPH-BR) por grupo de edad**

La curvas de tendencia de la prevalencia global tiene la figura de U poco pronunciada. La prevalencia es máxima entre el grupo de 15-24 años, seguida por la del grupo de 55 o más años.

Los tipos de VPH-AR tuvieron la prevalencia de infección más alta (72.3%) en el grupo de 15 a 24 años. En los grupos de 25 a 34 años y de 35 a 44 años las prevalencias disminuyeron a 65.6% y 59.3%, respectivamente; en los de 44 a 54 y de 55 o más años las prevalencias fueron similares (59.8% y 58.8%, respectivamente) (Fig. 5).

El primer pico de prevalencia en el grupo de VPH-BR, de 29.7%, correspondió al grupo de 15 a 24 años, igual que el de los tipos de VPH-AR. La prevalencia de infección disminuyó a 21.4% en el grupo de 25 a 34 años y se mantuvo igual (21.6%) en el grupo de 35 a 44 años. En el grupo de 45 a 54 años la prevalencia fue la más baja (14.5%) y aumentó a 19.1% en el grupo de 55 o más años (Fig. 5).

El tipo de VPH-AR más prevalente en todos los grupos etarios fue VPH-33, seguido de VPH-16. El tercer tipo más prevalente varió con la edad: VPH-56 en el grupo de 15 a 24 años, VPH-51 en el de 25 a 34 años, VPH-52 en el de 35 a 44 años, VPH-18 en el de 45 a 54 y VPH-68 en el grupo de 55 o más años (Tabla 2).

La prevalencia de infección por VPH-33 fue similar en los grupos de 15 a 24 y de 25 a 34 años (35.6% y 35.3%, respectivamente), disminuyó en el grupo de 35 a 44 años (28.6%) años, fue máxima entre los 45 y 54 años (38.5%) y descendió en el grupo de 55 o más años (26.5%).

La prevalencia de infección por VPH-16 fue 20.8% en el grupo de 15 a 24 años, ligeramente más baja y similar en los grupos de 25 a 34 y 35 a 44 años (16.8% y 18.1%, respectivamente) y disminuyó al 8.5% en el grupo de 45 a 55 años, al contrario de VPH-33; en las mujeres de 55 o más años volvió a aumentar la prevalencia de VPH-16 (20.6%) a un nivel similar al del grupo 15 a 24 años (Tabla 2).

### **Prevalencia de la infección por VPH según el grado de las lesiones neoplásicas**

La prevalencia de infección por VPH correlacionó claramente con el grado de las lesiones neoplásicas y fue máxima con CaCu. En ausencia de lesiones la prevalencia de infección por VPH fue 29.6% y con ASCUS fue 53.3%. En mujeres

con LBG la prevalencia de infección por VPH fue 67.7%, 72.3% con LAG y 90.5% con CaCu. La asociación de la infección por VPH con el grado de las lesiones neoplásicas fue significativa ( $P = 0.0001$ ) (Tabla. 3).

La prevalencia de VPH-AR en las participantes sin lesiones (29.6%) fue igual a la del grupo con VPH; con ASCUS fue 26.7%, 63.3% con LBG, 68.2% con LAG y 90.5% con CaCu. La tendencia de la infección por VPH-AR aumentó con el grado de las lesiones neoplásicas y fue similar a la observada en la infección global por VPH (Fig. 6).

En contraste, las prevalencias de infecciones por VPH-BR fueron similares desde ASCUS (26.7%) hasta CaCu (28.6%), en tanto que en los casos sin lesiones la prevalencia de infección por VPH-BR fue sólo 7.4% (Fig. 6).

Las prevalencias de las infecciones únicas (i.e., por un solo tipo de VPH) en mujeres con LBG, LAG y CaCu fueron semejantes (36.4%, 33.1% y 33.3%, respectivamente), claramente mayores que en mujeres sin lesiones (14.8%), pero menores que en mujeres con ASCUS (53.3%) (Fig. 7).

Las infecciones múltiples no fueron detectadas en mujeres sin lesiones, pero su prevalencia fue del 14.8% en ASCUS (Tabla 3). A diferencia de la tendencia de las infecciones únicas, las infecciones múltiples aumentaron con el grado de las lesiones: 31.3% en LBG, 39.2 en LAG y 57.1% en CaCu (Fig. 7).

### **Tipos de VPH según el grado de las lesiones neoplásicas**

Los tres tipos de VPH-AR más prevalentes en LBG fueron, en orden descendente, VPH-33 (39.5%), VPH-16 (14.9%) y VPH-56 (6.3%). VPH-16 fue el tipo más prevalente en LAG (20.3%) seguido por VPH-33 (16.3%) y VPH 39 (11.5%). En CaCu predominó VPH-16 (47.6%), seguido por VPH-33 (38.1%) y VPH-39 (19.0%). VPH-18 ocupó el cuarto lugar en las LBG, LAG y CaCu. En mujeres sin lesiones los tipos de VPH-AR más comunes fueron VPH-33 (18.5%), VPH-16 y -51 (11.1%) y en las mujeres con ASCUS los únicos tipos detectados fueron VPH-33 (13.3%), -51 y -39 (6.7%) (Fig. 8).

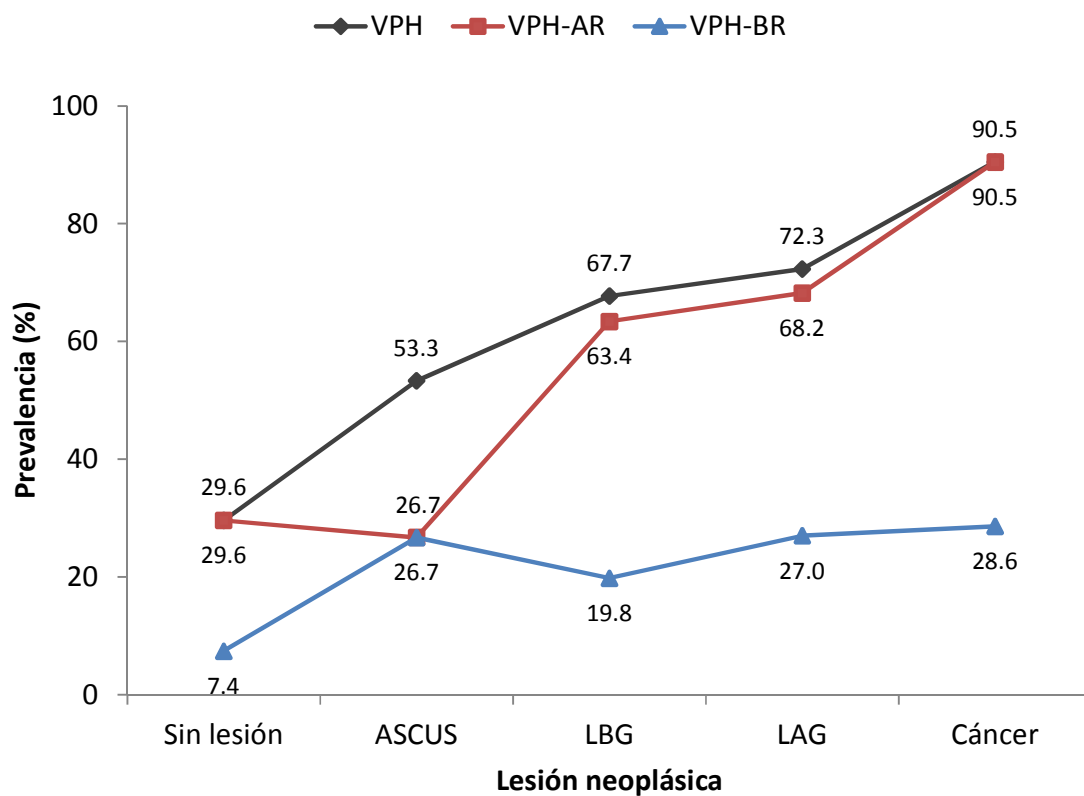
Los tipos de VPH-BR en las LBG fueron principalmente VPH-43 (7.8%), VPH-6,11 (7.2%) y VPH-66 (4.9%); en las LAG VPH-6,11 (13.5%), VPH-43 y -66 (7.4%) y en CaCu VPH-6,11(14.3%) VPH-43 y -44 (9.5%) (Fig. 8).

Las frecuencias de las lesiones neoplásicas de grado creciente con infección por VPH fueron LBG entre los 25 y 34 años, seguidas por LAG entre los 35 y 44 años; las de CaCu comenzaron desde los 25 años (Fig. 9).

**Tabla 3. Prevalencias de VPH por grado de lesión neoplásica en las infecciones por VPH-AR, -BR, únicas y múltiples y por tipos virales específicos (N = 700)**

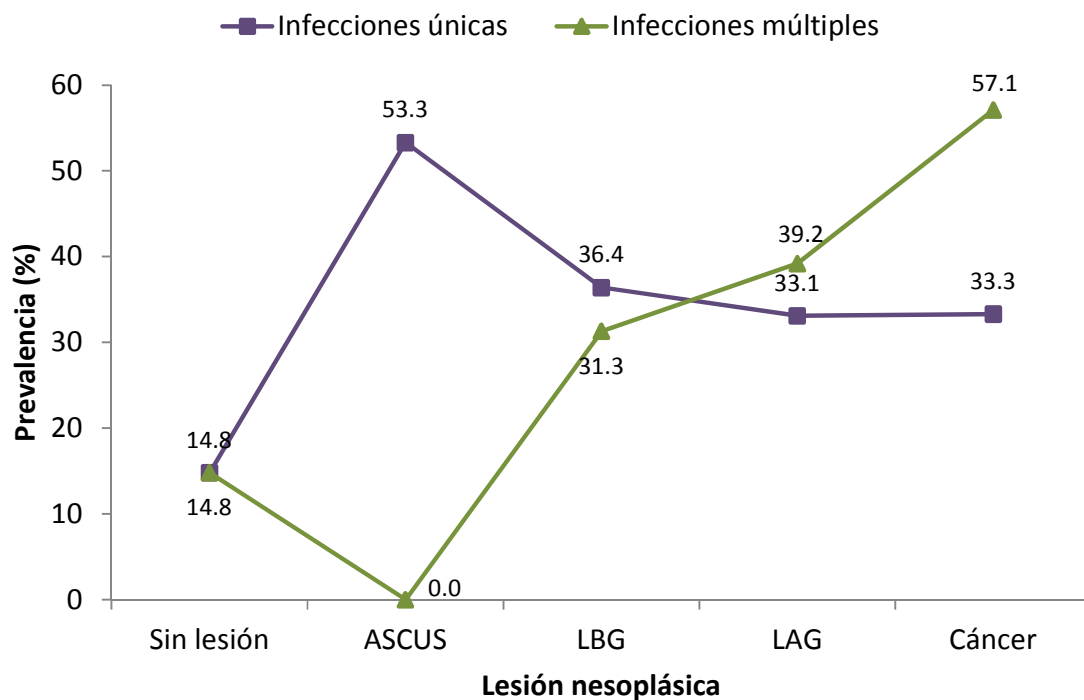
Categoría de infección y tipos virales	Prevalencia por grado de lesión neoplásica									
	Sin lesión (N = 27)		ASCUS (N = 15)		LBG (N = 489)		LAG (N = 148)		Cáncer (N = 21)	
	n	% (IC 95%)	n	% (IC 95%)	n	% (IC 95%)	n	% (IC 95%)	n	% (IC 95%)
<b>Totales</b>	8	29.6 (13.8-50.2)	8	53.3 (26.6-78.7)	331	67.7 (63.3- 71.8)	107	72.3 (64.3-79.3)	19	90.5 (69.6-98.8)
<b>Tipos de VPH-AR</b>	8	29.6 (13.8-50.2)	4	26.7 (7.8-55.1)	310	63.4 (58.9- 67.6)	101	68.2 (60.1-75.6)	19	90.5 (69.6-98.8)
16	3	11.1 (2.4-29.2)	0	0.0 (0.0-0.0)	73	14.9 (12.0-18.5)	30	20.3 (14.1-27.7)	10	47.6 (25.7-70.2)
18	1	3.7 (0.1-19.0)	0	0.0 (0.0-0.0)	28	5.7 (3.9-8.3)	15	10.1 (5.8-16.2)	3	14.3 (3.0-36.3)
31	0	0.0 (0.0-0.0)	0	0.0 (0.0-0.0)	9	1.8 (0.9-3.6)	8	5.4 (2.4-10.4)	2	9.5 (1.2-30.4)
33	5	18.5 (6.3-38.1)	2	13.3 (1.7-40.5)	193	39.5 (35.1-44.0)	24	16.2 (10.7-23.2)	8	38.1 (18.1-61.6)
35	1	3.7 (0.1-19.0)	0	0.0 (0.0-0.0)	4	0.8 (0.3-2.2)	4	2.7 (0.7-6.8)	2	9.5 (1.2-30.4)
39	2	7.4 (0.9-24.3)	1	6.7 (0.2-31.9)	21	4.3 (2.7-6.6)	17	11.5 (6.8-17.8)	4	19.0 (5.4-41.9)
45	0	0.0 (0.0-0.0)	0	0.0 (0.0-0.0)	7	1.4 (0.6-3.1)	4	2.7 (0.7-6.8)	0	0.0 (0.0-0.0)
51	3	11.1 (2.4-29.2)	1	6.7 (0.2-31.9)	26	5.3 (3.6-7.8)	15	10.1 (5.8-16.2)	2	9.5 (1.2-30.4)
52	0	0.0 (0.0-12.8)	0	0.0 (0.0-0.0)	20	4.1 (2.6-6.4)	10	6.8 (3.3-12.1)	0	0.0 (0.0-0.0)
56	1	3.7 (0.1-19.0)	0	0.0 (0.0-0.0)	31	6.3 (4.4-9.0)	11	7.4 (3.8-12.9)	0	0.0 (0.0-0.0)
58	1	3.7 (0.1-19.0)	0	0.0 (0.0-0.0)	25	5.1 (3.4-7.6)	13	8.8 (4.8-14.6)	3	14.3 (3.0-36.3)
59	0	0.0 (0.0-0.0)	0	0.0 (0.0-0.0)	12	2.5 (1.3-4.4)	6	4.1 (1.5-8.6)	0	0.0 (0.0-0.0)
68	0	0.0 (0.0-0.0)	0	0.0 (0.0-0.0)	25	5.1 (3.4-7.6)	15	10.1 (5.8-16.2)	2	9.5 (1.2-30.4)
<b>Tipos de VPH-BR</b>	2	7.4 (0.9-24.3)	4	26.7 (7.8-55.1)	97	19.8 (16.4- 23.7)	40	27.0 (20.1-34.9)	6	28.6 (11.3-52.2)
42	0	0.0 (0.0-0.0)	0	0.0 (0.0-0.0)	16	3.3 (1.9-5.4)	5	3.4 (1.1-7.7)	0	0.0 (0.0-0.0)
43	1	3.7 (0.1-19.0)	3	20.0 (4.3-48.1)	38	7.8 (5.6-10.6)	11	7.4 (3.8-12.9)	2	9.5 (1.2-30.4)
44	1	3.7 (0.1-19.0)	0	0.0 (0.0-0.0)	2	0.4 (0.1-1.6)	2	1.4 (0.2-4.8)	2	9.5 (1.2-30.4)
6, 11	0	0.0 (0.0-0.0)	0	0.0 (0.0-0.0)	35	7.2 (5.1-9.9)	20	13.5 (8.5-20.1)	3	14.3 (3.0-36.3)
66	1	3.7 (0.1-19.0)	1	6.7 (0.2-31.9)	24	4.9 (3.2-7.3)	11	7.4 (3.8-12.9)	0	0.0 (0.0-0.0)
<b>Únicas</b>	4	14.8 (4.2-33.7)	8	53.3 (26.6-78.7)	178	36.4 (32.2-40.9)	49	33.1 (25.6-41.3)	7	33.3 (14.6-57.0)
<b>Múltiples</b>	4	14.8 (4.2-33.7)	0	0 (0.0-0.0)	153	31.3 (27.2-35.6)	58	39.2 (31.3-47.5)	12	57.1 (34.0-78.2)

La prevalencia individual de cada tipo incluye infecciones únicas y múltiples. IC significa intervalo de confianza



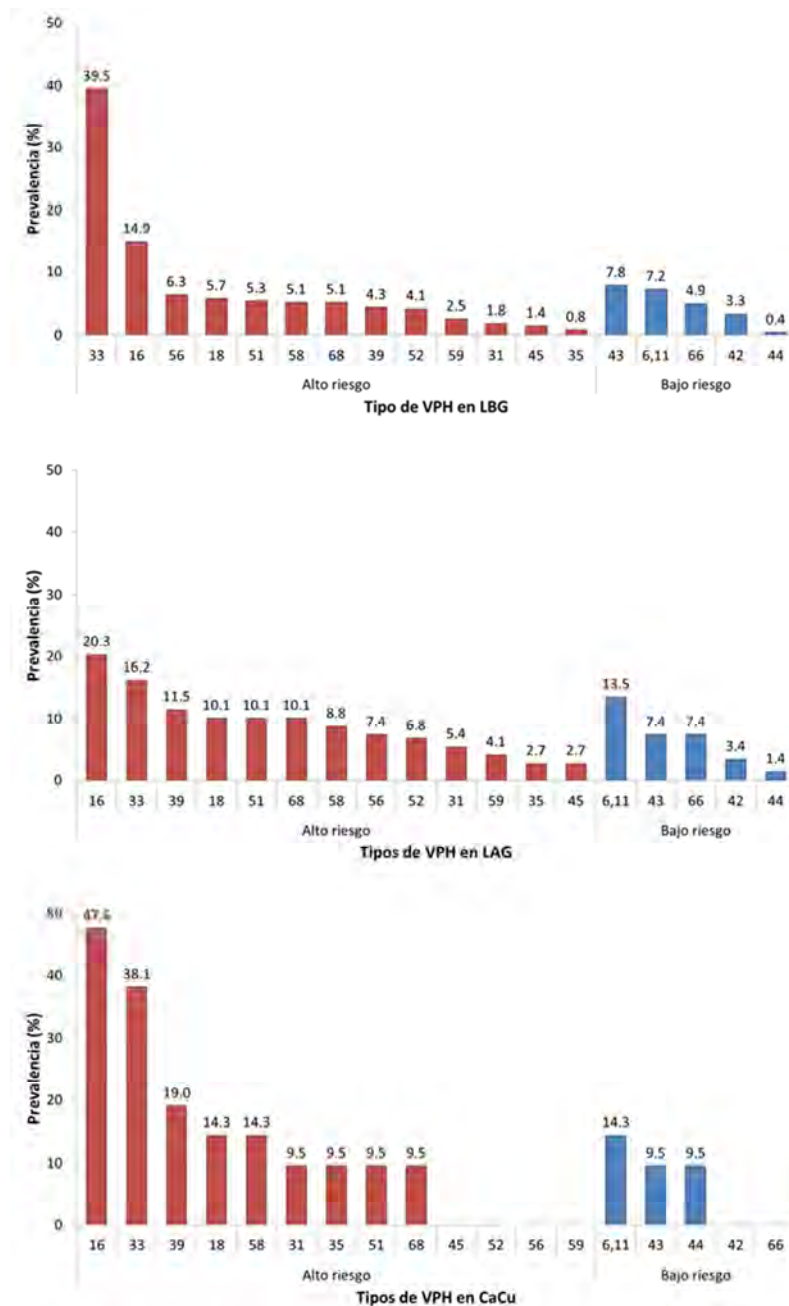
**Fig. 6. Prevalencias de las infecciones por VPH (global, por VPH-AR y VPH-BR) en lesiones neoplásicas de grado creciente**

La prevalencia de VPH aumenta progresivamente con el grado de las lesiones neoplásicas.



**Fig. 7. Prevalencia de las infecciones por VPH únicas y múltiples en lesiones neoplásicas de grado creciente**

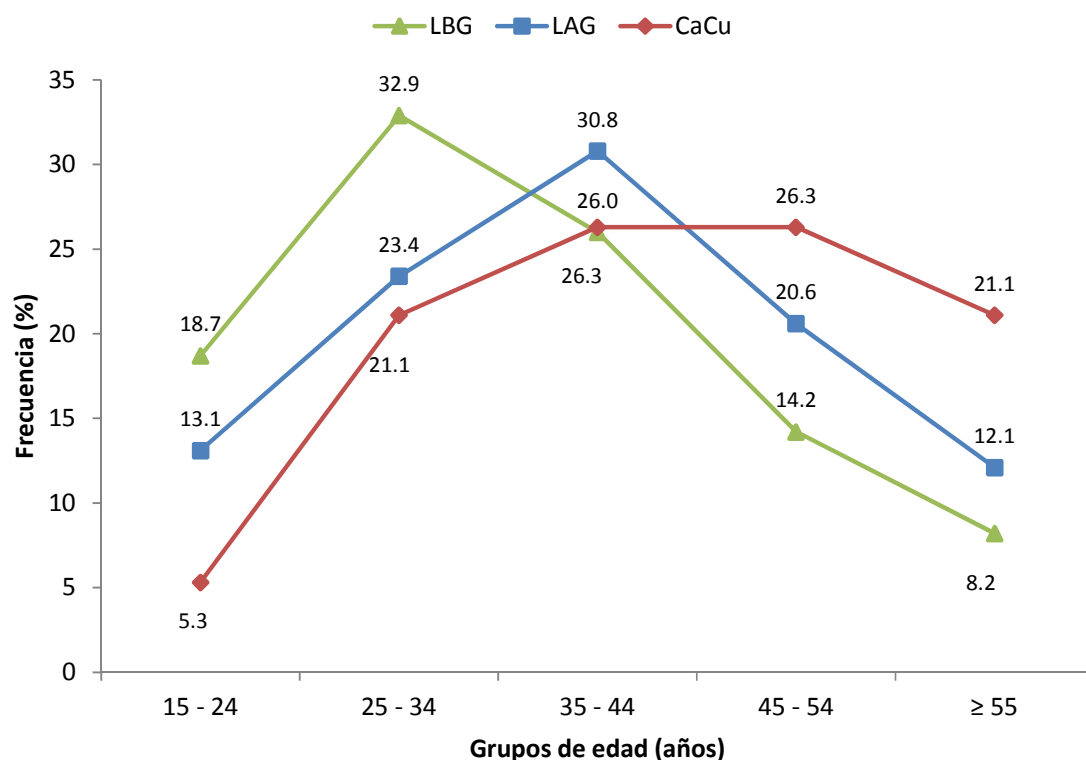
La prevalencia de las infecciones únicas es máxima en ASCUS y disminuye progresivamente desde LBG pasando por LAG hasta CaCu. La prevalencia de infecciones múltiples es nula en ASCUS y aumenta progresivamente desde LBG y es máxima en CaCu.



**Fig. 8. Prevalencia de los tipos de VPH-AR y BR en LBG, LAG y CaCu**

Los tipos de VPH difieren en lesiones de bajo grado (LBG), alto grado (LAG) y Cáncer de cérvix (CaCu). Conforme aumenta el grado de lesiones neoplásicas el VPH-16 aumenta y el VPH-33 disminuye. Tipos de VPH-AR en barras rojas y de VPH-BR en barras azules





**Fig. 9. Distribución de los casos de lesiones neoplásicas e infección por VPH por grupo de edad**

Las LBG con infección ascienden a partir del grupo de 15-24 años, alcanzan el máximo en el grupo de 25-34 años y descienden en los grupos de mayor edad. Las LAG con infección ascienden a partir del grupo de 15-24 años, alcanzan el máximo en el de 35-44 años y descienden en los grupos de mayor edad. Los casos de CaCu con infección ascienden a partir del grupo de 15-24 años, alcanzan el máximo en una meseta de los 35 a los 54 años, y descienden levemente en el grupo de  $\geq 55$  años.

## DISCUSIÓN

Este es el primer estudio sobre la prevalencia de los principales tipos de VPH anogenitales oncogénicos y no oncogénicos en una muestra representativa de mujeres tamizadas para la detección del CaCu y referidas a las clínicas de colposcopia de las seis jurisdicciones sanitarias del estado de San Luis Potosí.

Los resultados han permitido determinar las prevalencias de los 19 tipos de VPH circulantes que pueden ser identificados con el método empleado y correlacionarlas con la edad y las lesiones neoplásicas diagnosticadas por citología e histopatología del cérvix y servirán para planear estudios e intervenciones que mejoren la detección oportuna y el control del CaCu basado en evidencias en el estado.

Las prevalencias de las lesiones neoplásicas del cérvix entre las mujeres incluidas en el estudio son similares a las que han sido encontradas por otros autores en México y otros países, entre las cuales predominan las LBG con una prevalencia ~70% (IARC 2007).

Como se espera en mujeres con lesiones neoplásicas del cérvix diagnosticadas por Papanicolaou, dos tercios (67.6%) de las mujeres incluidas en el estudio tuvieron infección por VPH, lo cual representa una prevalencia casi seis veces mayor que el 10-14% encontrada en población abierta en México y en el mundo (Clifford et al. 2005a, Lazcano-Ponce et al. 2001).

Las prevalencias globales encontradas por nosotros para infecciones por un solo tipo de VPH ('únicas') y por múltiples tipos son similares (35.1% y 32.4%, respectivamente). Casi la mitad (48%) de las mujeres VPH-positivas tiene infecciones múltiples, con una prevalencia del 32%, ubicada dentro del intervalo del 20-50% encontrado en estudios internacionales (Vaccarella et al. 2010).

En el estado de San Luis Potosí circulan todos los 19 tipos de VPH-AR y -BR identificables por el método de PCRMA empleado en el estudio (Sotlar et al. 2004). La prevalencia global de los tipos de VPH-AR difiere significativamente de las descritas en estudios epidemiológicos mundiales, así como en Sudamérica, Centroamérica y otras regiones de México (Clifford et al. 2005b, Clifford et al. 2003a, Illades-Aguir et al. 2010, Lopez-Revilla et al. 2008, Smith et al. 2007). Los

tipos de VPH-AR circulantes más prevalentes en el estado (VPH-33, -16 y -18 = -58) contrastan con el orden de prevalencia esperado globalmente (VPH-16, -18, -31) y con la prevalencia reportada previamente en San Luis Potosí y Guanajuato (Lopez-Revilla et al. 2008). La prevalencia de VPH-33 duplica la de VPH-16 y difiere de la encontrada en estudios epidemiológicos mundiales y en México (Clifford et al. 2005a, Clifford et al. 2005b, Clifford et al. 2003a, Clifford et al. 2003b, Lazcano-Ponce et al. 2001, Lopez-Revilla et al. 2008). Este estudio también confirma la importancia de la vigilancia epidemiológica a través de la tipificación de VPH en una región geográfica y una época dadas.

Este trabajo constituye además el primer informe de los tipos de VPH-BR circulantes en el estado de San Luis Potosí, entre los cuales VPH-6/11 y -43 resultaron ser los más prevalentes. El método de PCRMA empleado por nosotros no distingue entre VPH-6 y VPH-11, pero como el tipo 6 es el más prevalente en el mundo (Burchell et al. 2006), creemos que probablemente también predomina en la región.

La prevalencia de la infección por VPH-edad específica es mayor a la observada previamente en mujeres de población abierta con citología cervical normal (Castle et al. 2005, Franceschi et al. 2006, Herrero et al. 2005, Lazcano-Ponce et al. 2001). La tendencia de la curva de prevalencia de VPH-edad específica en el estado de San Luis Potosí tiene la forma esperada de U, aunque menos pronunciada que la de estudios internacionales en población abierta (Castle et al. 2005, Franceschi et al. 2006, Herrero et al. 2005) debido a que nuestra población es de mujeres en las que se habían diagnosticado displasias y cáncer cervical. Los valores máximos de prevalencia obtenidos por nosotros en los extremos de la curva de tendencia corresponden a los grupos de 15-24 años (78%) y de 55 años (69%) y son similares a los reportados previamente en México y Latinoamérica (Castle et al. 2005, Franceschi et al. 2006, Lazcano-Ponce et al. 2001).

La distribución de las lesiones neoplásicas del cérvix entre las mujeres tamizadas para detección del CaCu y atendidas en las clínicas de colposcopia de

San Luis Potosí es similar a la encontrada previamente en el estado, en el país y en otros países, con predominio de las LBG (IARC 2007).

Este estudio confirma que la prevalencia de infección por VPH es mayor a medida que aumenta el grado de las lesiones neoplásicas y tiene valores similares a los ya descritos en el mundo (Guan et al. 2012, IARC 2007) y en México (Illades-Aguiar et al. 2010). La prevalencia de infección por VPH encontrada por nosotros en los casos sin lesiones (29.6%) cae dentro del rango de 14% a 40% descrito para México (Illades-Aguiar et al. 2010, Lazcano-Ponce et al. 2001) y en el mundo (Clifford et al. 2005a, de Sanjose S. et al. 2007).

La concordancia entre la infección por VPH en los casos de CaCu encontrada por nosotros (90.5%) es similar a la descrita en estudios globales (IARC 2007) y refuerza la noción de que la inmensa mayoría de los casos de CaCu se deben a la infección persistente por VPH-AR (de Sanjose Silvia et al. 2010).

La discordancia entre el diagnóstico citológico de las lesiones neoplásicas y las infecciones por VPH resulta tanto del sobrediagnóstico citológico de los casos con lesiones aparentes sin infección por VPH (32.4%) como de la insuficiente sensibilidad de la citología y la colposcopia en los casos de infección sin lesión (29.6%). Estos datos refuerzan la noción de que la detección del DNA de VPH es preferible a la citología cervical como prueba primaria de tamizaje del CaCu (Naucler et al. 2007, Sankaranarayanan et al. 2009), que acaba de establecerse oficialmente en Holanda (Meijer et al. 2009).

Las prevalencias de los tres tipos de VPH-AR más comunes en orden descendente en las LBG (VPH-33, -16 y -56) difieren también de las encontradas en las LAG (-16, -33 y -39) y CaCu (-16, -33 y -39), concuerdan con que VPH-16 es el tipo más oncogénico y por tanto más prevalente en las lesiones neoplásicas más avanzadas. VPH-33 prevalece mayoritariamente en las LBG en contraste con un estudio internacional donde VPH-16 es el más prevalente en las LBG en el mundo (Clifford et al. 2005b).

Nuestro trabajo también sugiere que la detección y tipificación de VPH entre las participantes en los programas de detección oportuna mejoraría la detección y

el control del CaCu más que la citología cervical, pues sólo las mujeres con infección por VPH-AR corren el riesgo de desarrollar CaCu y las mujeres sin infección están libres de riesgo.

La mayor prevalencia de VPH-33 sobre VPH-16 en el estado de San Luis Potosí sugiere que en esta región la eficacia de las vacunas cuadrivalente (Gardasil) o divalente (Cervarix) es insuficiente para prevenir la infección por VPH-AR.

Este estudio está siendo complementado con otro que está a punto de concluir Claudia Magaña para identificar los tipos de VPH en bloques de parafina de casos confirmados de CaCu en San Luis Potosí. Una vez que hayan sido analizados esos resultados podremos comparar las prevalencias de los tipos de VPH que infectan el cérvix y los que causan CaCu, determinar el riesgo relativo que representan los tipos de VPH circulantes para el desarrollo del CaCu y proponer cuáles serían las vacunas profilácticas polivalentes más eficaces en el estado.

## REFERENCIAS

- Burchell AN, Winer RL, de Sanjose S, Franco EL (2006) Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine* 24 Suppl 3: S3/52-61.
- Castle PE, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC et al. (2005) A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *The Journal of infectious diseases* 191: 1808-1816.
- Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Munoz N, Snijders PJ et al. (2005a) 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: 991-998.
- Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G et al. (2005b) Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 14: 1157-1164.
- Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S (2003a) Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *British journal of cancer* 89: 101-105.
- Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S (2003b) Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British journal of cancer* 88: 63-73.
- de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L et al. (2007) Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *The Lancet infectious diseases* 7: 453-459.
- de Sanjose S, Quint WGV, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE et al. (2010) Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The lancet oncology* 11: 1048-1056.

- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324: 17-27.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C et al. (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer Journal international du cancer* 127: 2893-2917.
- Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, Snijders PJ, Arslan A et al. (2006) Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *International journal of cancer Journal international du cancer* 119: 2677-2684.
- Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjose S et al. (2012) Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: A meta-analysis from cervical infection to cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 131: 2349-2359.
- Herrero R, Castle PE, Schiffman M, Bratti MC, Hildesheim A et al. (2005) Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *The Journal of infectious diseases* 191: 1796-1807.
- IARC (2007) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human Papillomaviruses. Lyon: International Agency for Research on Cancer 90: 1-670.
- Illades-Aguir B, Alarcon-Romero Ldel C, Antonio-Vejar V, Zamudio-Lopez N, Sales-Linares N et al. (2010) Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women from Southern Mexico. *Gynecologic oncology* 117: 291-296.
- Lacey CJ, Lowndes CM, Shah KV (2006) Chapter 4: Burden and management of non-cancerous HPV-related conditions: HPV-6/11 disease. *Vaccine* 24 Suppl 3: S3/35-41.
- Lazcano-Ponce E, Herrero R, Munoz N, Cruz A, Shah KV et al. (2001) Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *International journal of cancer Journal international du cancer* 91: 412-420.
- Lopez-Revilla R, Martinez-Contreras LA, Sanchez-Garza M (2008) Prevalence of high-risk human papillomavirus types in Mexican women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Infectious agents and cancer* 3: 3.
- Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL et al. (2009) Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *International journal of cancer Journal international du cancer* 124: 516-520.
- Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL (2006) Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 24 Suppl 3: S3/42-51.
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X et al. (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England journal of medicine* 348: 518-527.
- Naucler P, Ryd W, Tornberg S, Strand A, Wadell G et al. (2007) Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *The New England journal of medicine* 357: 1589-1597.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sankaranarayanan R, Nene BM, Shastri SS, Jayant K, Muwonge R et al. (2009) HPV screening for cervical cancer in rural India. *The New England journal of medicine* 360: 1385-1394.
- Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S et al. (2007) Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *International journal of cancer Journal international du cancer* 121: 621-632.
- Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A et al. (2004) Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology* 42: 3176-3184.
- SSA (2006a) Malignant cervix uterii tumor C53 cases by reporting source and federative entity 2006. Mexico City: Morbidity Yearbooks.  
[\[http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/8000/casos/fuente/097.pdf\]](http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/8000/casos/fuente/097.pdf).
- SSA (2006b) Mild and moderate cervical dysplasia N87.0-N87.1 cases by reporting source and federative entity 2006. Mexico City: Morbidity Yearbooks.  
[\[http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/8000/casos/fuente/117.pdf\]](http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/8000/casos/fuente/117.pdf).

- SSA (2006c) Severe cervical dysplasia and cervical cancer in situ N87.2-D06 cases by reporting source and federative entity 2006. Mexico City: Morbidity Yearbooks.  
[\[http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/8000/casos/fuente/118.pdf\]](http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/8000/casos/fuente/118.pdf).
- SSA (2008) Mortality in women (age-standardized) by non-communicable diseases by state of residence. Mexico City: National Health Information System.  
[\[http://sinais.salud.gob.mx/descargas/xls/m\\_016.xls\]](http://sinais.salud.gob.mx/descargas/xls/m_016.xls).
- Vaccarella S, Franceschi S, Snijders PJ, Herrero R, Meijer CJ et al. (2010) Concurrent infection with multiple human papillomavirus types: pooled analysis of the IARC HPV Prevalence Surveys. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention* : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology 19: 503-510.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA et al. (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology* 189: 12-19.
- zur Hausen H (1996) Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochimica et biophysica acta* 1288: F55-78.