

Virus del herpes simple tipo 2: influencia en el origen de las lesiones premalignas y malignas del cuello uterino

Dr. José T. Núñez Troconis*, Lic. Yenddy Carrero**, Lic. Jennifer Gotera**, Dra. Mariela Delgado de Fox***, Lic. Diana Callejas**, Lic. Mary Araujo**, Lic. Raimy Mindiola**, Dra. Jesvy Velásquez**

* Hospital "Manuel Noriega Trigo". Departamento de Ginecología y Obstetricia. ** Instituto de Investigaciones Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. *** Laboratorio de Anatomía- Patológica. Policlínica Maracaibo. Maracaibo, Estado Zulia

RESUMEN

Objetivo: Determinar si la interacción del virus del herpes simple tipo 2 con diferentes factores epidemiológicos, tiene influencia en las lesiones premalignas y malignas del cuello uterino.

Ambiente: Ambulatorios de Los Olivos, Cujicito, Salud Maracaibo, La Victoria y la consulta de Patología de Cuello Uterino del Hospital "Manuel Noriega Trigo", (Seguro Social), Maracaibo.

Métodos: Cincuenta y tres pacientes con neoplasia intraepitelial cervical y 10 controles fueron analizadas. Se tomó un hisopado cervical para la determinación del virus del herpes simple tipo 2 mediante la técnica de la inmunofluorescencia indirecta y para el virus del papiloma humano por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa.

Resultados: La presencia del virus del herpes simple-2 fue del 27,65 % (n=18) de las pacientes. Las pacientes con lesiones premalignas del cerviz (n = 48) y las pacientes del grupo control (n = 10) presentaron un 27,1 % y 30 % de positividad al virus del herpes simple-2, respectivamente. No se encontró ninguna asociación entre el virus del herpes simple-2 y la neoplasia intraepitelial cervical.

Conclusiones: El virus del herpes simple-2 no está asociado a las lesiones premalignas del cuello uterino.

Palabras clave: Herpes virus simple tipo 2. Neoplasia intraepitelial cervical. Virus del papiloma humano. Inmunofluorescencia indirecta.

SUMMARY

Objective: To determine if the interaction of herpes simplex virus type 2 with different epidemiological factors, had influence in premalignant and malignant lesions of uterine cervix.

Setting: Out-patient clinic of Los Olivos, Cujicito, Salud Maracaibo, La Victoria and out patient cervical pathology clinic, "Manuel Noriega Trigo" Hospital, IVSS, Maracaibo.

Methods: Fifty three patients with cervical intraepithelial neoplasia and 10 control patients were studied. A cervical swab sample was obtained for determination of the herpes simplex virus type 2 using an indirect immunofluorescence method and for the human papillomavirus with the polymerase chain reaction technique.

Results: The presence of herpes simplex virus type 2 was 27.65 % (n=18) of patients. Patients with cervical premalignant lesions (n = 48) and patients of control group (n = 10) presented 27.1 % and 30 % of positivity of herpes simplex virus type 2, respectively. There was no association between herpes simplex virus type 2 and cervical intraepithelial neoplasia.

Conclusions: The herpes simplex virus type 2 is not associated to premalignant lesions of uterine cervix.

Key words: Herpes simplex virus type 2. Cervical intraepithelial neoplasia. Human papilloma virus. Indirect immunofluorescence.

INTRODUCCIÓN

La infección genital por herpes virus es la causa más frecuente de ulceraciones genitales tanto en países desarrollados como en los países en desarrollo (1-3). La infección causada por el virus del herpes simple tipo 2 (VHS-2) es la mayor causa de herpes genital y el 78 % al 97 % son infecciones

asintomáticas (1).

La seroprevalencia del VHS-2 es un factor dependiente de la edad y varía desde un 20 % a un 40 % (4-6) en la población general, hasta un 90 % en poblaciones de alto riesgo como las sexuales (4). La seroprevalencia en mujeres en Latinoamérica ha sido reportada en un 35,8 % en la ciudad de México (6), 42 % en Sao Paulo, Brasil (5) y, en Costa Rica en 39,4 % (7). En Venezuela, Monsalve y col. (8) reportaron una prevalencia de 21,1 % en la población general.

En la mujer, los factores de riesgo más influyentes en adquirir la seropositividad del HVS-2 son la edad, años de actividad sexual y múltiples compañeros sexuales (7,9). Algunos autores reportan asociación con relaciones sexuales a una edad temprana (5,10), paridad (11), múltiples compañeros sexuales (12), estado civil (9,11), bajo nivel socio-económico (9,11), bajo nivel educativo (9), cigarrillo (12), duchas vaginales (6), consumo de cocaína (12) y enfermedades de transmisión sexual (ETS) (4,6).

El objetivo de este estudio fue determinar si la interacción del VHS-2 con diferentes factores epidemiológicos especialmente con el virus del papiloma humano (VPH), tiene una influencia importante en las lesiones premalignas del cuello uterino.

MÉTODOS

Durante el período comprendido entre enero de 2002 y octubre de 2004 se diagnosticaron 76 pacientes con neoplasia intraepitelial cervical (NIC) en más de 400 pacientes que acudieron a las diversas jornadas de pesquisa de cáncer del cuello uterino realizadas en los ambulatorios de Los Olivos, Cujicito, Salud Maracaibo y La Victoria ubicados en la ciudad de Maracaibo, Municipio Maracaibo y, a la consulta de patología de cuello uterino del Hospital "Manuel Noriega Trigo", Instituto Venezolano de los Seguros Sociales (IVSS), en la ciudad de Maracaibo, Municipio San Francisco.

Los criterios de inclusión que se usaron fueron: pacientes con NIC sin tratamiento previo, no estar embarazada, no estar tomando drogas inmunosupresoras y no presentar ninguna enfermedad inmunosupresiva y la toma del hisopo cervical para realizar la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y determinar la presencia del VHS-2 y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR siglas en inglés) para determinar la presencia del VPH. Sesenta y tres de las 76 mujeres llenaron los criterios de inclusión.

Cada paciente fue informada de la investigación y sus objetivos, requiriéndose de la firma del formato de consentimiento para participar en el estudio. El protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia, el Comité de Bioética y Bioseguridad del Fonacit y el Comité de Bioética del Hospital Manuel Noriega Trigo, IVSS, propuesto por el Departamento de Obstetricia y Ginecología y el Laboratorio Regional de Referencia Viroológica (LRRV) de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.

A cada mujer se le practicó toma de la citología cervico-vaginal (CCV), colposcopia y examen pélvico. De hallarse una atipia colposcópica, se procedía a tomar muestra para la determinación del VHS-2 y VPH utilizando un hisopo estéril de alginato, a nivel de la lesión y sus alrededores, así como también, de la unión escamo-columnar. Luego se realizaba biopsia dirigida por colposcopio; la muestra se colocaba en formalina al 10 % y posteriormente embebida en parafina para la realización de cortes de 3 μ y coloración con hematoxilina-eosina para su diagnóstico histopatológico. La CCV fue reportada siguiendo los criterios del Sistema Bethesda y el diagnóstico histológico se basó en los criterios establecidos por Richard (13). Las muestras obtenidas eran llevadas al LRRV donde se almacenaban a 4° C para su posterior procesamiento. A cada paciente seleccionada se le realizó historia clínica completa.

Se utilizó el método de IMAGENTM herpes simple virus type 1 y 2, (DAKO Diagnostics Ltd). La técnica que se siguió es la siguiente: se agregaron 25 μ L del reactivo VHS-2 que contiene anticuerpos monoclonales específicos contra el VHS-2 en un diámetro de 6 mm sobre el extendido celular de la muestra de la paciente, en una lámina porta-objeto que trae el kit para tal efecto; en una segunda lámina se realizó la extensión de una solución con células positivas al VHS-2, que viene con el kit, las cuales se usan como control positivo. Se procedió a incubar ambas láminas, control y muestra, por 30 min a 37° C en cámara húmeda. Posteriormente, se quitó el exceso del reactivo agitándolas por 5 minutos con buffer fosfato salino (PBS siglas en inglés) pH 7,5; luego se eliminó el exceso de PBS y se dejó que las láminas se secaran a una temperatura entre 15-30° C.

Se agregó una gota de IMAGEN fluido de montaje en el centro de la lámina, se colocó un cubreobjeto sobre el fluido de montaje y la muestra, y se procedió a examinar por completo los 6 mm de diámetro en

las áreas que contenían células, usando el microscopio de epifluorescencia (OLYMPUS, BX-MAX 50, NY, EE.UU). La fluorescencia debe ser visible con un objetivo de 200X y 500X.

Al momento de procesar la muestra para la extracción del ADN se esperó que la torunda, almacenada a 4° C alcanzara temperatura ambiente, luego se le agregó 1,5 mL de cloruro de sodio 0,9 %, se agitó en vortex y se transfirió el sobrenadante a un tubo de reacción con tapa estéril. Se centrifugó por 10 minutos a 12 000 revoluciones por minuto (rpm), incluyendo los controles negativos que contenían un mL de cloruro de sodio al 0,9 % por cada serie de muestras a procesar. Inmediatamente, se descartó el sobrenadante con pipeta y se agregaron a cada una de las muestras 50 µL de proteinasa K y 50 µL de solución de digestión. Se procedió a incubar a 55° C durante 2 horas. Posteriormente, se llevaron a una temperatura de 100° C por 10 minutos para inactivar la proteinasa K, se centrifugó por 10 minutos a 12 000 rpm y por último, se transfirió el sobrenadante a un tubo de reacción estéril de donde se tomó 5 µL para el proceso de amplificación y el resto fue guardado a -20° C.

Reacción de amplificación del ADN

En esta etapa se utilizó la técnica de PCR amplificando un fragmento de 450 pares de bases (pb) dentro de la región L1 del marco de lectura abierto (ORF-siglas en inglés) del virus.

Se utilizó un tubo de reacción suministrado por el kit de Pharma Gen, que contiene 30 µL de aceite de parafina en la fase superior y 45 µL de mezcla de reacción en la fase inferior, se le agregó una alícuota de 5 µL de la muestra previamente extraída, posteriormente los tubos fueron llevados al termociclador (PTC-100TM), el cual se programó con los siguientes ciclos: 1 ciclo de 94° C por 4 minutos, 35 ciclos de 94° C por 1 minuto; 52° C por 1,5 minutos; 72° C por 2 minutos y un ciclo de 72° C por 10 minutos luego 4° C continuo hasta la recolección de los tubos.

Una vez amplificado el material extraído se procedió a tomar 10 µL del mismo y se mezcló con 2 µL de solución de carga, este procedimiento se realizó sobre la superficie de un papel parafinado y luego fue cargado en un gel de agarosa al 2 % en buffer tris-borato (TBE) 1X. El resto del material amplificado se conservó a 4° C para la tipificación del virus con enzimas de restricción en caso de ser positivo los resultados. Adicionalmente se utilizó el marcador de peso molecular 0,5 µg de ADN

Molecular Weight Marker VIII (Boehringer Mannheim), se programó la corrida electroforética a 8 V/cm (80 V para un gel de 10 cm de largo) durante una hora.

El revelado se realizó al colocar el gel en el transiluminador modelo UVTM-25, mediante luz ultravioleta (UV). Los geles fueron fotografiados para determinar la presencia de infección por VPH. Se observó sólo una banda correspondiente al control interno de 1 200 pb en los casos negativos. Los casos positivos al VPH además de la banda del control interno, se observó otra banda de 450 pb correspondiente al ADN del virus. La ausencia de bandas se consideró como muestras inhibidas.

Genotipificación del VPH con enzimas de restricción

Al determinar qué pacientes eran positivas al VPH, a las muestras con el material viral amplificado se le agregaba las enzimas de restricción suministradas por el kit PHARMAGEM-VPH FAS. Luego a cada tubo de amplificación de las muestras positivas para VPH, se le añadió 1 µL de enzima 1 de restricción, se resuspendió y se transfirieron 20 µL a otro tubo de reacción, al cual se le adicionó 1 µL de enzima 2 de restricción. Posteriormente se incubaron 2 tubos por cada muestra a 37° C durante dos horas; luego se le adicionaron 3 µL de solución de carga a los tubos y se transfirieron 15 µL por cada tubo a un gel de agarosa de alta resolución al 2,5 % en TBE 1X. Se utilizó un marcador de peso molecular 0,5 µg de DNA Molecular Weight Marker VIII (Boehringer Mannheim) y se corrió la electroforesis a 8 V/cm (80 V para un gel de 10 cm de largo) durante una hora. La banda de 450 pb correspondiente al VPH se fragmentó originando un patrón de banda dependiendo del tipo de virus y se identificó comparándolas con un esquema anexo al kit que las ubica por el tamaño de la banda. El control interno de 1 200 pb originó dos bandas de 550 y 650 pb verificando así la efectividad de las enzimas. (PHARMA GEN, S.A., España).

Para el análisis estadístico se empleó la versión para Windows del programa SSPS 11.5. Las variables continuas fueron analizadas empleando el X²-test y la prueba exacta de Fisher. Se utilizó la regresión logística para estimar el papel independiente de las variables estudiadas especialmente el VHS-2 y el VPH en las lesiones premalignas del cuello uterino. También fue estimado el riesgo relativo (RR) y el intervalo de confianza (IC) del 95 %.

RESULTADOS

Se diagnosticaron 76 (88,4 %) pacientes con lesiones premalignas del cuello uterino y 10 (11,6 %) mujeres con el cervix sano, que se incluyeron como controles. Se tomaron muestras con el hisopo para VHS-2 y VPH en 63 mujeres (73,2 %),

La edad promedio fue de $32,9 \pm 1$ años (rango: 17-59); 51 de ellas (81 %) refirieron haber estado embarazadas, 36 (57 %) habían parido y 12 (19 %) reportaron haber tenido abortos. El promedio de la edad del primer parto fue $19,3 \pm 2,7$ años (rango: 13-25), el promedio de embarazo fue de 3 ± 2 (rango: 1-11), el de parto fue $2,9 \pm 1,7$ (rango: 1-8) y el de aborto fue $1,6 \pm 1,1$.

La primera relación sexual fue a los $19,2 \pm 4,7$ años (rango: 11-38). El promedio de compañeros sexuales fue de $1,8 \pm 1$. Sesenta (95,2 %) eran sexualmente activas al momento del estudio. Treinta y cinco mujeres (55,6 %) eran casadas. Dieciséis (25,4 %) mujeres dijeron tener sexo oral y 7 (11,1 %) tener sexo anal. Veintinueve (46 %) reportaron tener un solo compañero sexual, ocho pacientes (12,7 %) manifestaron haber tenido una infección de transmisión sexual (ITS), de las cuales, sólo una dijo padecer de herpes genital.

Treinta (47,6 %) pacientes usaban algún método contraceptivo al momento del estudio, los anticonceptivos orales (ACO) fueron el método más utilizado (43,3 %). El empleo de métodos anticonceptivos antes del estudio fue 58,7 % ($n = 37$) de las mujeres, siendo los ACO el método más empleado en un 44,4 %. Las duchas vaginales como método de higiene vaginal eran empleadas por 39 pacientes (62 %).

Doce eran fumadoras activas (19 %), 5 (8 %) fueron fumadoras y el 73 % restante nunca habían fumado. Treinta y una pacientes (49,2 %) ingerían alcohol; el 71,4 % ($n = 45$) manifestaban el hábito cafeico.

Ocho pacientes (12,7 %) tenían antecedentes de infección de transmisión sexual.

La CCV reportó 9 casos (14,3 %) con alteraciones celulares: 2 células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS-siglas en inglés), 2 lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL-siglas en inglés), 4 lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL-siglas en inglés) y 1 con cambios carcinomatosos. Al comparar la presencia del HVS-2 con los resultados de las CCV en relación con la presencia y ausencia de atipias celulares, no se encontró diferencia estadísticamente significativa.

En 40 CCV (63,5 %), se encontraron patologías asociadas, siendo la más frecuente la *Gardnerella vaginalis* (Gv) en 27 (67,5 %) de las pacientes. Las otras patologías asociadas encontradas fueron: 8 casos con *Candida albicans*, 2 casos con *Trichomonas vaginales* (Tv), y 2 pacientes con Gv y Tv.

Se reportaron 48 casos con patología cervical atípica (76,2 %), se excluyeron 5 (7,9 %) pacientes por no tener diagnóstico histopatológico. El estudio por PCR del VPH reportó positivo en 9 casos (14,7 %).

El estudio del VHS-2 por IFI fue positivo en 18 pacientes (28,6 %). Al comparar el número de pacientes positivos a VHS-2 con las pacientes que no presentaban la infección, no se encontró ninguna diferencia estadística ($P = 0,137$).

De las 18 pacientes positivas a VHS-2, 10 (55,6 %) tenían 31 años o más, al comparar la edad con la presencia del VHS-2, no se encontró ninguna significancia estadística. Siete (38,9 %) de las 18 positivas a VHS-2 eran monógamas y comenzaron su actividad sexual a los 17 o menos años de edad ($P = 0,472$). El estado civil no influyó la presencia del VHS-2; 5 mujeres eran solteras (27,8 %), 10 casadas (55,6 %) y 3 divorciadas (16,7 %) ($P = 0,874$).

Se compararon las diferentes variables sexuales con el VHS-2, sólo se encontró significancia estadística con la variable "sexualmente activa" como se observa en el Cuadro 1. El 61,1 % de las pacientes VHS-2 positivas refirieron haber tenido 2 o más compañeros sexuales.

El Cuadro 2 muestra la comparación de la presencia del VHS-2 en relación con la edad de las pacientes, número de embarazo, partos, y duchas vaginales. No se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa.

Se analizó si el uso de las píldoras anticonceptivas y el uso de preservativos influenciaban la presencia del VHS en dichas mujeres. Igualmente, no se halló ninguna diferencia estadísticamente significativa.

Los hábitos tabáquico, alcohólico y cafeico no fueron factores de riesgo en la presencia de la positividad del VHS-2 como se observa en el Cuadro 3.

La presencia del VHS-2 en las pacientes que presentaban PVA en la CCV fue altamente significativa al compararlas con aquellas que no reportaron ninguna patología [$P = 0,00007$; riesgo estimado (RE): 2.045; intervalo de confianza (IC): 1,517 - 2,758] Cuadro 4. Asimismo, al comparar

VIRUS DEL HERPES SIMPLE TIPO 2

las 27 pacientes con Gv en la CCV con las otras 45 CCV, se encontró que la presencia conjunta de la Gv y el VHS-2 fue estadísticamente significativa (P= 0,001; RE: 8,615; IC: 2,384-31,131) Cuadro 5. Cuando se compararon los patógenos entre sí, es decir, candidas, Tv y bacterias con la Gv, no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa (P = 0,312).

Cuadro 1
VHS-2 y variables sexuales

Variable	P	RR	I C
1ª relación sexual*	0,935	1,048	0,341-3,222
Nº compañeros sexuales #	0,472	0,665	0,219-2,026
Sexualmente activas	0,02	0,833	0,678-1,025
Relaciones sexuales orales	0,360	1,469	0,661-3,266
Relaciones sexuales anales	1	1	0,289-3,464

P=significancia; RR: Riesgo Relativo; IC: Intervalo de Confianza

* Se tomó como edad límite para dividir RS tempranas: 17 o > años y 18 o > años

Se tomó como número de compañero: 1 y 2 o >

Cuadro 2
VHS-2, edad, embarazos, partos y contracepción

Variable	P	RR	I C
Edad	0,625	1,318	0,435-3,990
Embarazos	0,085	4	0,562-27,181
Partos	0,782	1,179	0,521-2,638
Contracepción actual	0,578	1,375	0,626-3,022
ACO	0,623	1,300	0,442-3,824
Preservativos	0,497	0,842	0,562-1,251
Contracepción en el pasado	0,418	1,405	0,606-3,262
Duchas vaginales	0,512	1,115	0,796-1,563

P= significancia; RR: riesgo relativo; IC: intervalo de confianza

Edad: se tomó como edad límite: 30 o < y 31 o > años

Cuadro 3
Virus del herpes simple tipo 2 y hábitos

Variable	Nº (%)	HSV-2 (%)	P	RR	I C
Fumó	8(5)	2(60)	0,636	1,350	0,428-4,262
Fuma	12(19)	3(25)	1,000	0,850	0,292-2,474
Licor	41(49,2)	6(19,4)	0,111	0,516	0,221-1,203
Café	45(71,4)	11(24,4)	0,252	0,629	0,290-1,362

HSV-2: Virus del herpes simple tipo 2; P= significancia; RR: riesgo relativo;

IC: intervalo de confianza.

Cuadro 4
Virus herpes simple-2 y patología vaginal asociada en la CCV

Herpes virus	Patología vaginal				Total	
	Si Nº	%	No Nº	%	Nº	%
Si	18	*100	0	0	18	100
No	22	48,9	23	51,1	45	100
Total	40	63,5	23	36,5	63	100

CCV: citología cérvico-vaginal

*P= 0,00007

Cuadro 5
Presencia del virus del herpes simple tipo 2 y Gardnerella vaginalis

Herpes virus	Gardnerella vaginalis				Total	
	Si Nº	%	No Nº	%	Nº	%
Si	14	*77,8	4	22,2	18	100
No	13	28,9	32	71,1	45	100
Total	27	42,9	36	77,1	63	100

P= 0,001

Cuando se comparó la presencia de la Gv y el VHS-2 y su influencia en las lesiones premalignas del cervix, no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa.

En el Cuadro 6 se puede observar el número de pacientes con sus respectivos diagnósticos anatomopatológicos. Asimismo, cuando se analizó la presencia del VHS-2 en pacientes con y sin patología cervical, tampoco fue estadísticamente significativa ($P=0,851$). Cuando se compararon la presencia del VHS-2 lesión por lesión con las pacientes controles tampoco se encontró significancia estadística; sin embargo, se comparó cada uno de los tipos de lesión entre sí y la presencia del VHS-2, sólo NIC 2 ($P=0,01$) fue estadísticamente significativo como se puede apreciar en el Cuadro 5.

Cuadro 6
VHS-2 e histopatología

Histopatología	HVS Positivo*		HVS Negativo		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Normal	3	30	7	70	10	17,2
Condiloma plano	1	33,3	3	66,7	4	5,2
NIC 1	7	21,2	26	78,8	33	56,9
NIC 2#	4	80	1	20	5	8,6
NIC 3	1	16,7	5	83,3	6	10,3
Carcinoma invasor	-	-	1	100	1	1,7
Total	16	27,6	42	72,4	58	100

* $P=0,137$

$P=0,01$

No se encontró ninguna influencia de los diferentes factores estudiados y la positividad por IFI del VHS-2 en las lesiones premalignas del cervix, para ello se empleó la regresión logística.

Se reportaron 9 casos positivos (14,3 %) al VPH, de los cuales 3 presentaban co-infección con el VHS-2, representando el 33,3% de los casos VPH positivos y el 16,7 % de los 18 casos positivos a VHS-2 ($P=0,815$). Igual que en los otros factores, no se encontró relación o influencia entre la presencia de ambos virus con la patología premaligna del cuello uterino.

DISCUSIÓN

La técnica de inmunofluorescencia indirecta permite detectar la presencia del antígeno a través de anticuerpos monoclonales murinos purificados específicos contra el VHS-2, conjugado con

isotiocianato de fluoresceína. Posee una especificidad del 90 % (14) y la sensibilidad es del 87 % (15).

La prevalencia de anticuerpos contra el VHS-2 ha sido reportado ser más alto en mujeres que hombres (9) la mujer tiene más riesgo de adquirir este virus. Estudios epidemiológicos sugieren que la seroprevalencia del VHS-2 alcanza el pico en la cuarta década de la vida (1,9). La prevalencia del VHS-2 en adultos es del 20 % (9).

Thankamani y col. (15) reportaron una incidencia de anticuerpos por IFI en tejidos de biopsias obtenidas de pacientes con carcinoma (Ca) del cuello uterino de 79 %. Pacsa y col. (16) encontraron en 52 muestras obtenidas por hisopado cervical en pacientes con displasia del cuello uterino un 61 % y en muestras de pacientes sin patología, un 9 %. Los resultados obtenidos en este estudio muestran un 30 % de VHS-2 en pacientes con cuello uterino normal y un 27,1 % en pacientes con lesiones premalignas del cuello uterino, usando células cervicales exfoliadas. Sólo una paciente positiva a VHS-2 dijo tener herpes genital (5,5 %). Fleming y col. (9) reportaron que sólo el 2,6 % de los adultos tenían VHS-2 y la seroprevalencia en esos pacientes fue del 81,5 % contra el 21,6 % del resto de la población.

Lazcano y col. (6) encontraron que las mujeres de 50 o más años de edad tenían 4 a 5 veces más probabilidades de tener VHS-2 positivo que las mujeres de 40 o de menos edad. Rodríguez y col. en Costa Rica (7) consiguieron esa misma tendencia. Hildesheim y col. (17) reportaron un 30 % de anticuerpos contra el VHS-2 en pacientes menores de 30 años. Esta investigación encontró un 44,4 % de incidencia en mujeres menores de 30 años y no se halló la tendencia del aumento de la prevalencia de anticuerpos contra el VHS-2 con el incremento de la edad.

Los mismos autores (17) hallaron que el 35 % de las mujeres monógamas eran positivas a VHS-2; e igualmente en un 35 %, en aquellas que habían empezado a ser sexualmente activas antes de los 20 años. Lazcano y col. (6) reportaron la existencia de una correlación significativa entre la presencia del VHS-2, el número de compañeros sexuales y la edad de la primera relación sexual. Smith y col. (5) encontraron que las mujeres filipinas que comienzan su actividad sexual antes de los 17 años tienen un riesgo 7 veces más alto de adquirir la infección del VHS-2 que aquellas que comienzan a tener relaciones sexuales a partir de los 21 años. Al mismo tiempo, encontraron que la seropositividad al VHS-2 en

Brasil es significativamente más alta en aquellas mujeres que refieren tener 2 o más compañeros sexuales a lo largo de su vida. Rodríguez y col. (7) sólo hallaron un aumento significativo de la prevalencia con respecto al número de compañeros sexuales. El presente estudio encontró un 38,9 % en aquellas pacientes que tenían un solo compañero sexual y que habían comenzado su actividad sexual antes de los 17 años; y ninguna correlación estadísticamente significativa entre estas variables y la presencia del VHS-2 (Cuadro 1), igualmente, ocurrió con el tipo de relación sexual. Cherpes y col. (18,19) tampoco encontraron correlación entre la positividad al VHS-2 y el sexo oral, ni correlación en aquellas mujeres que practicaban el sexo oral pero en aquellas a quienes les practicaba este tipo de sexo, sí se consiguió riesgo de adquirir el virus (19), asimismo, también reportaron riesgo de adquirir el VHS-2 cuando realizaban el sexo vaginal después de tener sexo anal (18); encontraron que las concubinas tenían más riesgo de tener VHS-2 positivo que las mujeres con diferentes estados civiles. Esta investigación no halló ninguna correlación entre el estado civil y la positividad del VHS-2.

En este estudio las mujeres que eran sexualmente activas fueron VHS-2 positivas en forma significativa ($P=0,02$). Si analizamos el intervalo de confianza (Cuadro 1) podemos observar que el resultado no tiene influencia importante en la presencia del VHS-2 y esto puede ser considerado circunstancial debido a que la mayoría del universo estudiado era sexualmente activa.

Lazcano y col. (6) reportaron que el número de embarazos, partos y contracepción actual y en el pasado no aumentaron el riesgo de tener anticuerpos contra el VHS-2 positivos. Otros autores (6,7) han reportado los mismos resultados. Los anticonceptivos orales tampoco influenciaron la adquisición del VHS-2 y el uso de preservativos no protegieron a nuestras pacientes de adquirir el virus (Cuadro 2). Rodríguez y col. (7) encontraron que los métodos de barrera protegen contra la seropositividad del VHS-2 en un 50 %. Narouz y col. (20) y Gottlieb y col. (21) no encontraron ningún efecto protector del preservativo en adquirir una infección herpética.

Las duchas vaginales tampoco influenciaron la presencia de la positividad del VHS-2 en el presente trabajo como se puede observar en el Cuadro 2. Resultados similares encontraron Cherpes y col. (18), sin embargo, estos autores en un estudio previo, sí reportaron la correlación entre esta variable y el VHS-2 (19). Lazcano y col. (6) encontraron una

correlación positiva entre la presencia del VHS-2 y el uso de las duchas vaginales especialmente en mujeres menores de 49 años. El número de trabajos publicados sobre la asociación de esta variable y el VHS-2 son pocos. Es posible que las duchas vaginales aumenten la susceptibilidad de la vagina a la infección herpética, bien sea alterando la flora vaginal normal o destruyendo el papel protector de la capa de mucina (producido por el cervix), facilitando la exposición del epitelio al virus (19).

Los hábitos tabáquico, alcohólico y cafeico no fueron determinantes en la positividad del VHS-2 en nuestras pacientes como se puede ver en el Cuadro 3, al igual que otros autores (6). Cherpes y col. (19) reportaron que el licor no fue ningún factor de riesgo pero el hábito del cigarrillo sí fue encontrado como factor de riesgo, cuando fue consumido los 4 meses que precedieron al estudio.

Esta investigación halló una elevada asociación entre la presencia del VHS-2 y la PVA. La patología vaginal descrita en este estudio fue la encontrada en la CCV. Similar asociación ha sido reportada por Cherpes y col. (18). Estos autores (19) encontraron una correlación positiva entre la presencia del VHS-2 y agentes patógenos como hongos, *Tv*, *Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Gv*. Gottlieb y col. (21) reportaron que la tricomoniasis y la vaginosis bacteriana (VB) son factores de riesgo para adquirir una infección por el VHS-2. Los autores mencionan que una alteración del microambiente de la vagina puede establecer condiciones que aumenten la susceptibilidad al VHS-2. Cherpes y col. (19, 20) han reportado la presencia de la infección por VHS-2 más baja (14,5 %) en mujeres con flora vaginal normal en comparación con aquellas que presentaban VB (41,8 %).

Igual que la cavidad oral y el tracto respiratorio superior, la vagina tiene mecanismos de defensa contra los agentes patógenos por lo que el microambiente vaginal normal tiene sus propios mecanismos de defensa y protección contra las infecciones. Los lactobacilos, productores de peróxido de hidrógeno podrían actuar como una primera línea de defensa especialmente contra los virus (22), asimismo, el lactobacilo tiene la capacidad de producir sustancias bactericidas y fungicidas capaces de inhibir un amplio espectro de bacterias y hongos (23). Cherpes y col. (22) mencionan que es posible que el lactobacilo pueda producir alguna sustancia no identificada todavía, que sea capaz de proteger contra una infección del VHS-2. El

lactobacilo metaboliza la glucosa en ácido láctico y este ambiente ácido permite una flora vaginal normal pero hace que sea un microambiente inhóspito para los agentes patógenos que invaden la vagina (24). Cherpes y col. (18) reportaron en el 2005 como factores de riesgos independientes la disminución del número de lactobacilos y la VB, en la adquisición de la infección por el VHS-2.

Cherpes y col. (22) también sugieren que el moco cervical que cubre el epitelio de la vagina y el cervix, brinda una protección contra el VHS-2. *In vitro*, se ha demostrado que el moco cervical por su viscosidad tiene la habilidad de atrapar el VHS (25). Sin embargo, los microorganismos asociados a la VB producen niveles elevados de mucinasa, sialidasa, y otras enzimas que degradan la mucina, incrementando la degradación del moco cervical y disminuyendo el papel protector (26,27) permitiendo o facilitando que el VHS-2 se adhiera a la capa de células epiteliales de la vagina y el cervix (22). Recientemente Cherpes y col. (18) sugirieron que en la VB hay una alteración importante en la concentración de varias citocinas comparadas en pacientes con flora vaginal normal y sugirieron que esto puede producir cambios locales o sistémicos que favorezcan la reactivación de la infección por el VHS-2.

Esta investigación encontró una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de la Gv y el VHS-2. Al realizar la regresión logística entre las lesiones premalignas del cuello uterino con las anteriores variables, no se encontró significancia estadística

La influencia del VHS-2 en las lesiones premalignas y malignas del cervix ha estado sujeta a mucha discusión (28). El rol del VHS-2 en esta patología fue considerado muy importante en los años 70 (29). Diferentes autores han demostrado la no asociación entre el VHS y Ca del cuello uterino (17,30,31). Francheschi y col. (32) y Muñoz y col. (33) demostraron que los pacientes con cáncer del cervix tenían niveles más elevados de anticuerpos contra el VHS-2 que los pacientes controles. Posteriormente, Muñoz y col. (34) no encontraron ninguna correlación entre la presencia de títulos de inmunoglobulina G clase 1 y 3 contra el VHS-2 y el Ca del cervix; basado en estos hallazgos, ellos no soportan la hipótesis de que la infección por el este virus tenga un papel importante en la neoplasia premaligna y maligna del cuello uterino.

Viiki y col. (29) reportaron una asociación entre el VHS-2 y el Ca del cervix estadísticamente

significativo y un elevado riesgo relativo que los llevó a concluir que el VHS-2 es un factor de riesgo para el origen y evolución del cáncer del cuello uterino. Eglin y col. (35) reportaron la presencia de ácido ribonucleico (ARN) específico a VHS-2 en forma ocasional en el núcleo de células de pacientes con Ca del cervix. También mencionan que el VHS-2 contiene regiones en su genoma que es capaz de transformar las células *in vitro* por lo cual se podría pensar que es capaz de producir una transformación oncogénica *in vivo*. Panditt y col. (36) utilizando el método de IFI en cortes realizados en tejidos en parafina y en CCV encontraron una asociación estadísticamente significativa entre el Ca invasivo, el Ca *in situ* del cervix y la presencia del VHS-2. También mencionan que la intensidad de la coloración en las láminas tratadas con IFI, decrece a medida que la lesión disminuye en severidad.

El resultado de este estudio no demuestra una asociación entre la positividad del VHS-2 y las lesiones premalignas del cervix.

Zur Hausen en 1982 (37) hipotetizó el posible papel sinérgico del VHS-2 y el VPH especialmente los tipos 16/18 en el inicio y evolución de las lesiones premalignas y malignas del cuello uterino. Hildesheim y col. (17) demostraron un papel etiológico del VHS-2 en esta patología cervical y la posible interacción entre este virus y el VPH en el desarrollo del cáncer del cuello uterino y sugieren que el rol del VHS-2 no es importante en ausencia del VPH. Igualmente mencionan que la presencia de la seropositividad del VHS-2 y el VPH-16/18 incrementan el riesgo de tener cáncer del cuello uterino en un 60 %, es decir, el riesgo aumenta 9 veces. Koffa y col. (38) en 1999 soportan los hallazgos de Hildesheim y col. (17) pero los primeros autores sugieren un rol importante del VHS-2 y el desarrollo del Ca del cervix por lo que concluyen que el VHS-2 tiene un papel etiológico independiente. Rodríguez y col. (7) en Costa Rica reportaron una asociación entre la presencia del VHS-2 y el VPH en forma significativa.

Viikki y col. (29) no encontraron una correlación entre ambos virus en el desarrollo del Ca del cuello uterino, asimismo, Yang y col. (39) encontraron en pacientes con cáncer del cuello uterino que la presencia del VHS-2 e infectadas con el VPH no era un factor de riesgo. El presente estudio no encontró ningún papel sinérgico del virus VHS-2 y el VPH en las lesiones premalignas del cuello uterino.

Este estudio permite concluir: 1. la positividad del HVS-2 en el hisopado cervical usando la IFI en

mujeres con lesiones premalignas del cuello uterino fue del 27,1 % y en el grupo de mujeres con cervix sano fue de 30 %; 2. la positividad fue muy elevada en pacientes sexualmente activas; 3. el preservativo no tuvo un papel protector en adquirir la infección por el VHS-2; 4. se encontró una alta correlación entre las infecciones vaginales asociadas especialmente la Gv y la presencia del VHS-2; 5. no se halló una asociación entre la presencia del VHS-2 y las lesiones premalignas del cuello uterino; 6. no se determinó un sinergismo entre la presencia del VHS-2 y el VPH y las lesiones premalignas del cervix.

Agradecimiento

Agradecemos a todo el personal de enfermería de las instituciones mencionadas arriba que colaboraron durante la realización de las diferentes jornadas de pesquisa de cáncer de cuello uterino, asimismo, al personal de enfermería de la Consulta de Patología del cuello uterino del Hospital "Manuel Noriega Trigo".

Igualmente queremos agradecer al personal del Centro de Referencia Viroológica del Instituto de Investigaciones Clínicas de la Facultad de Medicina, Universidad del Zulia que intervinieron en el procesamiento de las muestras tomadas y a la Dra. Isabel Olivares de Núñez por su colaboración en la revisión de este manuscrito.

REFERENCIAS

- Nahmias AJ, Lee FK, Beckman-Nahmias S. Seroepidemiological and sociological patterns of herpes simplex virus infection in the world. *Scand J Infect Dis.* 1990;69(Suppl):19-36.
- Chen CY, Ballard RC, Beck-Sague C, Dangor Y, Radebe F, Schmid S, et al. Human immunodeficiency virus infection and genital ulcer disease in South Africa: The Herpetic Connection. *Sex Transm Dis.* 2000;1:21-29.
- Duran N, Yarkin F, Evruke C, Koksall F. Asymptomatic herpes simplex virus type 2 (HSV-2) infection among pregnant women in Turkey. *Indian J Med Res.* 2004;120:106-110.
- Van de Laar ML, Termorshuizen F, Slomka MJ, Van Doornum GJJ, Ossewaarde JM, Brown DWG, et al. Prevalence and correlates of herpes simplex virus type 2 infection: Evaluation of behavioral risk factors. *Int J Epidemiol.* 1998;27:127-134.
- Smith J, Herrero R, Muñoz N, Eluf-Neto J, Ngelangel C, Bosch FX, et al. Prevalence and risk factors for herpes simplex virus type 2 infection among middle-age women in Brazil and the Philippines. *Sex Transm Dis.* 2001;28(4):187-194.
- Lazcano-Ponce E, Smith J, Muñoz N, Conde-Glez C, Juárez-Figueroa L, Cruz A, et al. High prevalence of antibodies to herpes simplex virus type 2 among middle-aged women in Mexico City, Mexico: A population-based study. *Sex Transm Dis.* 2001;28(5):270-276.
- Rodriguez AC, Castle PE, Smith JS, Bratti C, Hildesheim A, Schiffman M, et al. A population based study of herpes simplex virus 2 seroprevalence in rural Costa Rica. *Sex Transm Infect.* 2003;79:460-465.
- Monsalve F, Estévez J, Costa L, Salas M, Hernández M, Olaya J, et al. Seroepidemiología del virus herpes simple 2 en una población indígena Yukpa, Estado Zulia, Venezuela. *Rev Méd Chile.* 2001;129(3):247-252.
- Fleming DT, McQuillan GM, Johnson RE, Nahmias AJ, Aral SO, Lee FK, et al. Herpes simplex virus type 2 in the United States, 1976 to 1994. *N Engl J Med.* 1997;337:1105-1111.
- Austin H, Macaluso M, Nahmias A, Lee FK, Kelaghan J, Fleenor M, et al. Correlates of herpes simplex virus seroprevalence among women attending a sexually transmitted disease clinic. *Sex Transm Dis.* 1999;26:329-334.
- Buchacz K, McFarland W, Hernandez M, Klausner JD, Page-Shafer K, Padian N, et al. Prevalence and correlates of herpes simplex virus type-2 in a population-based survey of young women in low-income neighborhoods of Northern California. *Sex Transm Dis.* 2000;27(7):393-400.
- Wald A, Langenbaerg AG, Link K, Izu A, Ashley R, Warren T, et al. Effect of condoms on reducing the transmission of herpes simplex. *JAMA.* 2001;285:3100-3106.
- Richart RM. *Pathology Annual S.C.* Nueva York: Sommers Editors; 1997.
- Hoffman BE, Jungkind DL, Haller GJ, Sharrar R, Baker RA, Weisberg M. Evaluation of two rapid methods for the detection of herpes simplex virus antigens inpatient specimens. *Ann Clin Lab Science.* 1985;5(5):418-427.
- Thankamani V, Kumari TV, Vasudevan DM. Detection of herpes simplex virus type-2 antigen(s) in biopsies from carcinoma of uterine cervix. *J Exp Pathol.* 1985;2(2):123-133.
- Pacsa AS, Kummerlander L, Pejtsik B, Krommer K, Pali K. Herpes simplex virus-specific antigens in exfoliated cervical cells from women with and without cervical anaplasia. *Cancer Res.* 1976;36:2130-2132.
- Hildersheim A, Mann V, Brinton LA, Szklo M, Reeves W, Rawls W. Herpes simplex virus type 2: a possible interaction with human papillomavirus types 16/18 in the development invasive cervical cancer. *Int J Cancer.* 1991;49:335-340.
- Cherpes TL, Melan MA, Kant JA, Cosentino LA, Meyn LA, Hillier SL. Genital tract shedding of herpes simplex virus type 2 in women: Effects of hormonal contraception, bacterial vaginosis, and vaginal group B

- Streptococcus colonization. *Clin Infect Dis*. 2005;40(10):1422-1428.
19. Chernes TL, Meyn LA, Krohn MA, Hillier SL. Risk factors for infection with herpes simplex virus type 2: Role of smoking, douching, uncircumcised males, and vaginal flora. *Sex Trans Dis*. 2003;30(5):405-410.
 20. Narouz N, Allan PS., Wade AH, Wagstaffe S. Genital herpes serotyping: A study of the epidemiology and patients' knowledge and attitude among STS clinic attenders in Coventry, UK. *Sex Transm Infect*. 2003;79:35-41.
 21. Gottlieb SI, Douglas JM, Foster M, Schmid DS, Newman DR, Baron AE, et al. Incidence of herpes virus type 2 infection in 5 sexually transmitted disease (STD) clinics and the effect of HIV/STD risk-reduction counseling. *J Infect Dis*. 2004;190:1059-1067.
 22. Chernes TL, Meyn LA, Krohn MA, Lurie JG, Hillier SL. Association between acquisition of herpes simplex virus type 2 in women and bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis*. 2003;37:319-325.
 23. McGroarty J. Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1993;6:251-264.
 24. Valore E, Park C, Igeti S, Ganz T. Antimicrobial components of vaginal fluid. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;187:561-568.
 25. Olmsted S, Padgett J, Yudin A, Whaley K, Moench T, Cone R. Diffusion of macromolecules and virus-like particles in human cervical mucus. *Biophys J*. 2001;81:1930-1937.
 26. McGregor JA, French JI, Jones W, Milligan K, McKinney PJ, Patterson E, et al. Bacterial vaginosis is associated with prematurity and vaginal fluid mucinase and sialidase: Results of a controlled trial of topical clindamycin cream. *Am J Obstet Gynecol*. 1994;170(4):1048-1059.
 27. Olmsted JJ, Meyn LA, Hillier SL. Glycosidase and proteinase activity of anaerobic gram negative bacteria isolated from women with bacterial vaginosis. *Sex Transm Dis*. 2003;30:257-261.
 28. Boyle DCM, Smith JR. Infection and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer*. 1999;9:77-86.
 29. Viikki M, Pukkala E, Nieminen P, Hakama M. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncol*. 2000;39(1):71-75.
 30. Lehtinen M, Dillner J, Knedt P, Luostarinen T, Aromaa A, Kirnbauer R, et al. Serologically diagnosed infection with human papillomavirus type 16 and risk for subsequent development of cervical carcinoma: Nested case-control study. *BMJ*. 1996;312:537-539.
 31. Vonka V, Kanka J, Hirsch I. Prospective study on the relationship between cervical neoplasia and herpes simplex type 2 virus: I. Epidemiological characteristics. *Int J Cancer*. 1984;33:333-338.
 32. Francheschi S, Doll R, Gallwey J, La Vecchia C, Peto R, Spriggs AI. Genital warts and cervical neoplasia: An epidemiological study. *Br J Cancer*. 1983;48(5):621-628.
 33. Muñoz N, de-The G, Aristizabal N, Yee C, Rabson A, Pearson G. Antibodies to herpesviruses in patients with cervical cancer and controls. *IARC Sci Publ*. 1975;11(2):45-51.
 34. Muñoz N, Kato I, Bosch FX, De Sanjose S, Sundquist VA, Izarzugaza I, et al. Cervical cancer and herpes simplex virus type 2: Case-control studies in Spain and Colombia, with special reference to immunoglobulin G sub-classes. *Int J Cancer*. 1995;60(4):438-442.
 35. Eglin R, Sharp F, Maclean A, Macnab JC, Clements JB, Wilkie NM. Detection of RNA complementary to herpes simplex virus DNA in human cervical squamous cell neoplasms. *Cancer Res*. 1981;41:3597-3603.
 36. Panditt AA, Khilnani PH, Powar H, Bhavé GG, Chadda NO. Detection of HSV-2 in carcinoma cervix and premalignant conditions by immunochemistry. *J Postgrad Med*. 1990;36(4):185-190.
 37. Zur Hausen H. Human genital cancer: Synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiating events? *Lancet*. 1982;2(8312):1370-1372.
 38. Koffa M, Koumantakis E, Ergazaki M, Tsatsanis C, Spandidos DA. Association of herpesvirus infection with the development of genital cancer. *Int J Cancer*. 1995;27;63(1):58-62.
 39. Yang YY, Koh LW, Tsai JH, Tsai CH, Wong EFC, Lin SJ, et al. Correlation of viral factors with cervical cancer in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2004;37:282-287.

Correspondencia a:

Dr. José T. Núñez Troconis
 Laboratory of Molecular Technology
 National Cancer Institute/SAIC Frederick
 915 Toll House Ave Suite 211
 Frederick, MD 21701 EE.UU
 e-mail: jnunez@ncifcrf.gov; jtnunezt@hotmail.com
 Teléfono N°: 301-846-6440
 Fax N°: 301-846-6100
 Celular : 240-422-9456