

# Detección molecular de VPH por PCR-RFLP en muestras del área ano-genital de hombres en el Estado Mérida, Venezuela

Mg Scs. Militzá Quintero, Jhon Cruz, Marco Bastidas, Lcda. Danmarys Hernández, Drs. Adriana Rodríguez, Juan Puig

## RESUMEN

**Objetivo:** Determinar el porcentaje de positividad y tipo de virus de papiloma humano en el área genito-anal de hombres, relación con la edad, sitio anatómico y tipo de muestra, en el Departamento de Biología, Laboratorio de Biología y Medicina Experimental Facultad de Ciencias. LABIOMEX Universidad de Los Andes.

**Métodos:** Estudio descriptivo, transversal, de 882 muestras del área genito-anal de hombres que acudieron voluntariamente a la consulta para detección y tipificación de virus de papiloma humano mediante reacción en cadena de la polimerasa y análisis de restricción.

**Resultados:** El porcentaje de positividad y tipo de virus del papiloma humano encontrado fue de 49,9 % donde el virus de papiloma humano de alto riesgo fue de 46,2 %, (VPH16: 12,4 %, VPH18: 11,0 % y VPH31: 6 %) y virus de papiloma humano de bajo riesgo el 53,8 % (VPH6: 35,8 % y VPH11: 12 %). El cepillado fue más eficiente en rendir ADN de buena calidad. El rango de edad 20-26 años fue el más numeroso. Se encontró una fuerte asociación entre muestras de la región anal y virus de papiloma humano de alto riesgo comparado con las muestras de otras áreas genitales (Chi-cuadrado=7,405, P=0,05).

**Conclusiones:** El porcentaje de positividad de virus de papiloma humano encontrado en este estudio es alto, con una frecuencia importante de virus de papiloma humano de alto riesgo, y con una fuerte asociación con muestras de la región anal. La tasa de cáncer cervical en nuestro país es alta, en comparación con otros países de la región, la alta frecuencia de virus de papiloma humano de alto riesgo en nuestra población masculina puede ser un factor que contribuya a que más mujeres se infecten con tipos oncogénicos y desarrollen esta enfermedad.

**Palabras clave:** Virus de papiloma humano. Cáncer genito-anal. Población masculina. PCR- RFLP.

## SUMMARY

**Objective:** Determine the percentage of positivity and human papillomavirus type in the genital and anal area in men, related to age, anatomical site and type of sample.

**Method:** A descriptive, cross-sample of 882 genito-anal area of men who came voluntarily to the clinic for human papillomavirus detection and typing by PCR-RFLP.

**Environment:** Faculty of Sciences, Laboratory of Experimental Biology and Medicine LABIOMEX, Universidad de Los Andes. Merida, Merida, Venezuela.

**Results:** The human papillomavirus percentage of positivity was 49.9 % where human papillomavirus high risk was 46.2 % (HPV16: 12.4 %, HPV18: 11.0 % and HPV31: 6 %) and human papillomavirus low risk was 53.8 % (HPV6: 35.8 % and VPH11: 12 %). Brushing was more efficient in yield good quality DNA. The age range 20-26 years was the largest. We found a strong association between samples of the anal region and human papillomavirus high risk compared with samples from other genital areas (Chi-square = 7.405, P = 0.05).

**Conclusions:** The human papillomavirus prevalence found in this study was high, with a high frequency of human papillomavirus high risk and with a strong association with samples of the anal region. Cervical cancer rates in our country is high compared with other countries in the region, the high frequency of human papillomavirus high risk in our male population may be a contributing factor to more women becoming infected with oncogenic types and develop this disease.

**Key words:** Human papillomavirus. Genital and anal cancer. Male population. PCR-RFLP.

## INTRODUCCIÓN

La infección por virus de papiloma humano (VPH) está relacionada con el cáncer cervical, siendo este virus señalado como el agente etiológico de esta enfermedad (1). Puesto que se ha sugerido que el hombre juega un papel de reservorio y de vector de la infección por VPH (2-4), la pesquisa masculina puede tener una relevancia en la prevención del cáncer cervical. Por otra parte, estudios recientes indican que el virus puede asociarse de forma específica a estructuras en el espermatozoide de forma tal que puede eventualmente invadir el útero y permitir la adsorción de las partículas virales a los tejidos uterinos internos (5), con lo cual se justifica aún más proponer un programa de pesquisa que incluya a hombres.

Numerosos estudios han demostrado una alta frecuencia de VPH en muestras del área genital de mujeres con infecciones sintomáticas o asintomáticas; se propone que sus parejas sexuales masculinas deben ser la principal fuente de infección, sin embargo, la detección del ADN de VPH en las parejas masculinas de estas mujeres tiene una baja frecuencia (6); una posible explicación puede ser el acceso al área anogenital, el tipo de muestra obtenida y el dispositivo de muestreo.

En Venezuela no se han reportado estudios que indiquen la frecuencia de la infección por VPH de alto o bajo grado oncogénico en hombres, no se conoce la incidencia por grupos etarios y tampoco está claro que tipo de muestra del aparato reproductor masculino es la más adecuada para la realización de una prueba molecular. Los estudios clínicos se limitan a una inspección visual para detectar posibles lesiones clínicas con ayuda de la aplicación de una solución de ácido acético al 5 % de 3 a 5 min, procedimiento llamado penoscopia para evidenciar zonas acetoblancas (7).

A nivel mundial son pocos los estudios realizados en hombres para determinar la prevalencia del VPH tipo específico por edad, factores de riesgo, y tipo de muestra más adecuada (8). Sin embargo, se ha establecido que hay diferencias en la distribución del tipo de VPH; estas diferencias pueden deberse al tropismo del tejido de tipos de VPH particulares, debido al sitio anatómico muestreado, o a las diferencias en las poblaciones estudiadas, similar a lo que sucede en el caso de infección cervical (9). Esta información se necesita para mejorar o reforzar los programas que permiten el control del cáncer anogenital tanto en hombres como en mujeres. La determinación del porcentaje de positividad (PP) y

tipo de VPH en el área genito-anal de hombres, y su relación con la edad, el sitio anatómico y el tipo de muestra tomada es el objetivo principal que se plantea en este trabajo.

## MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en los municipios Libertador, Campo Elías, y Santos Marquina del Estado Mérida, Venezuela, donde se recibieron y evaluaron muestras del área genito-anal de 882 hombres que acudieron voluntariamente a la consulta pública o privada, y el médico especialista recomendó la realización de una prueba molecular para detección y tipificación de VPH. Las muestras fueron codificadas y cifradas para proteger la identidad de los participantes. Se consideró como criterios de elegibilidad para la inclusión en este estudio que la edad estuviera comprendida entre los 18 y los 62 años, y que no tuvieran un diagnóstico previo de cáncer anal o genital, o de una enfermedad de transmisión sexual reciente. Se tomaron para el estudio muestras del surco balano-prepucial, de la uretra distal, del escroto o de la región anal, mediante hisopos estériles de algodón, cepillos de citología, biopsias frescas de tejido, o tejidos incluidos en parafina. Se llenó una mini-historia clínica por participante, donde se recolectaron datos de edad, y en algunos casos, los hallazgos clínicos.

**Procesamiento de las muestras, extracción de ADN y análisis de VPH.** Las muestras fueron procesadas para la extracción de ADN por el método de fenol-cloroformo y se detectó la presencia de ADN de VPH mediante PCR con los oligonucleótidos consenso MY09/MY11, GP5+/GP6+ tipificando mediante RFLP según se describió (10,11). Para establecer asociaciones entre variables por el test Chi-cuadrado de Pearson y calcular frecuencias y porcentajes se utilizó el programa estadístico SPSS, v12.0. Mediante esto, se establecieron los tipos más frecuente de VPH en el grupo de estudio, el tipo de muestra más adecuada para la detección, la edad en que predomina la infección y el tipo de VPH más frecuente por área anatómica de muestreo.

## RESULTADOS

En este estudio, se seleccionaron y procesaron 882 muestras ano-genitales de hombres con edades comprendidas entre 18 a 62 años, que acudieron voluntariamente a la consulta urológica pública o privada del Estado Mérida, y solicitaron realizarse

## DETECCIÓN MOLECULAR DE VPH

una prueba molecular de detección de VPH. Del total de muestras procesadas el 49,9 % fueron positivas para VPH de cualquier riesgo, de las cuales solo se detectó el 2,3 % con infección múltiple. Los tipos virales oncogénicos representaron el 46,2 % de los cuales, VPH16 (12,4 %), VPH18 (11,0 %), VPH 31 (6 %), VPH53 y VPH58 (2,7 % c/u) fueron los más frecuentes; y los no oncogénicos representaron el 53,8 % con VPH6 (35,8 %), VPH11 (12,0 %), VPH83 (2,7 %) y VPH84 (1,3 %), como los más frecuentes

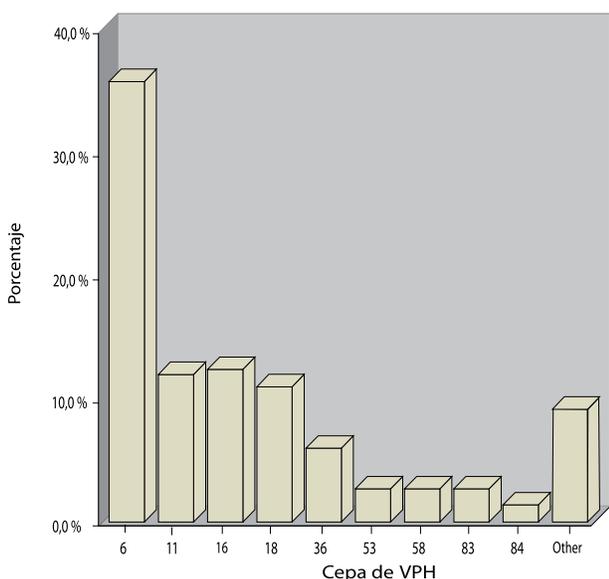


Figura 1. Tipos de VPH más frecuentes detectados en las muestras genito-anales.

(Figura 1). El rango de edad con mayor porcentaje de positividad para VPH de cualquier tipo (34,4 %), fue el de 20 a 26 años, con el 31,78 % de estas muestras positivas para VPH de alto riesgo oncogénico y el 43,42 % de bajo riesgo (ver Cuadro 1 y Figura 2). El

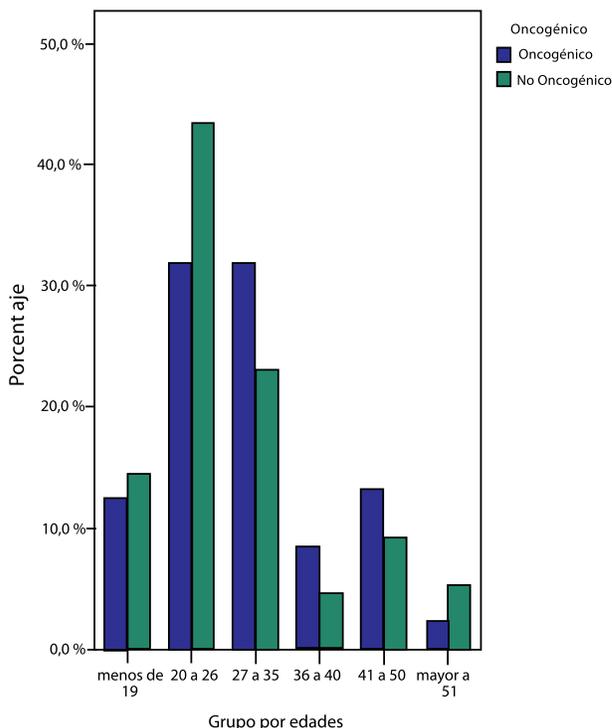


Figura 2. Porcentajes de tipo de VPH según su oncogenicidad por grupo etario.

Cuadro 1

Resultados de grupos de edad y tipos de muestras por tipo de VPH

Edad	Porcentaje positividad	VPH oncogénico	VPH no oncogénico	VPH de cualquier riesgo
Menor de 19	16,0	12,40	14,47	13,52
20 a 26	34,4	31,78	43,42	38,07
27 a 35	28,8	31,78	23,02	27,05
36 a 40	7,0	8,50	4,60	6,4
41 a 50	10,5	13,17	9,20	11,03
Mayor de 51	3,3	2,30	5,26	3,91
Tipo de muestra	Porcentaje	VPH oncogénico	VPH no oncogénico	VPH de cualquier riesgo
Hisopado de pene	34,93	40,00	30,58	34,93
Cepillado de pene	47,94	52,59	43,94	47,95
Otras	17,12	7,41	25,48	17,12

rango de edad que mostró una asociación significativa con infección por VPH de tipo oncogénico fue el de 20 a 26 años ( $\chi^2= 4,000$   $P=0,05$ ), comparado con los grupos restantes.

Las muestras recolectadas con cepillo citológico fueron levemente más eficientes en rendir ADN no degradado para la amplificación por PCR que las recolectadas con hisopo de algodón, esto se determinó mediante la PCR beta-globina que permite analizar la calidad del ADN para su amplificación por PCR. Así se obtuvo un 9,8 % del total de muestras que no produjeron un amplificado beta-globina, de las cuales el 47,4 % correspondieron a muestras obtenidas con los cepillos, y el 52,6 % para las muestras obtenidas con hisopos, estas muestras fueron excluidas del estudio.

Las muestras del área genital como cepillado o hisopado frescos, representaron el 82,87 %, las biopsias de tejido fresco, bloques de parafina de región genito/anal, raspado de la región anal y otros tipos de muestras, representaron el 17,12 % restante (Cuadro 1). Para determinar si existe una relación entre la zona anatómica, anal o pene, y el tipo de VPH, oncogénico o no oncogénico, se seleccionaron las muestras positivas para estas dos zonas, con el tipo de VPH determinado, para un total de 262 muestras (Cuadro 2). Las muestras del área genital (pene) tuvieron una menor asociación con VPH de tipo oncogénico que las muestras de la región anal, a pesar de la poca cantidad de estas últimas, observándose una fuerte asociación entre VPH oncogénico y región anal ( $\chi^2= 7.405$ ,  $P=0,05$ ). Un pequeño porcentaje de muestras resultaron con infección múltiple (patrón RFLP sobrepuesto para más de un VPH, 2,3 %), pero debido a la técnica de tipificación utilizada estos no pudieron identificarse. En este estudio no se tomó en cuenta si los participantes tenían pareja con infección por VPH, pero para algunos de ellos el médico reportó este dato, observándose que en un bajo porcentaje, la infección en ambos miembros de la pareja era por

el mismo tipo viral.

## DISCUSIÓN

En una revisión de las tasas de prevalencia de VPH de varios estudios, donde se tomaron muestras de sitios anatómicos múltiples, se encontró que estas podían llegar a ser muy altas y variables, desde 1,3 % hasta 72,9 %, en comparación con las tasas más bajas obtenidas para estudios con sitios anatómicos únicos como glande (6,5 % a 50 %), prepucio (24 % a 50 %), cuerpo del pene (5,6 % a 51,5 %), escroto (7,1 % a 46,2 %) y uretra (8,7 % a 50 %) (8); por tanto, la recomendación que se hizo a los médicos especialistas de practicar un barrido con el cepillo o el hisopo en todas las partes del pene y el escroto fue acertada, pues permitió estimar una mejor tasa de positividad (49,9 %). En cuanto a la técnica para tomar la muestra, en esa misma revisión, se comparan los estudios, utilizando cepillados, hisopados, secos o humedecidos, con raspado previo o sin él, observándose una mayor tasa de positividad con muestras tomadas con el hisopo o el cepillo humedecido en una solución salina estéril y luego de haber practicado un raspado previo suave con papel esmerilado, a diferencia de este trabajo donde los médicos especialistas tomaron muestras con cepillo o hisopo no humedecido y en su mayoría sin practicar raspado previo. Cabe resaltar que la técnica para obtener las muestras por cepillado o hisopado, fue explicada a los médicos especialistas, mediante instrucciones por escrito y se insistió en que la muestra debe ser tomada cuando el paciente tiene por lo menos doce horas sin higienizarse el área genital y que debe practicarse un barrido por todas las áreas del pene tales como surco, glande, cuerpo, y entrada de la uretra o meato, sin provocar sangrado. Tanto el cepillo como el hisopo deben airearse para permitir su secado, y guardarse en el sobre de papel suministrado,

Cuadro 2

Zona anatómica de muestreo y VPH oncogénico o no oncogénico

Zona anatómica	n	VPH oncogénico (%)	VPH no oncogénico (%)
Anal	20	4 (20)	16 (80)
Genital (pene)	242	125 (51,65)	117 (48,34)
Genital (otras)	620	-	-

$\chi^2$  cuadrado=7,405 ( $P=0,05$ )

con la finalidad de evitar que la humedad provoque el deterioro de la muestra por crecimiento bacteriano o fúngico, pero en muchos casos se observó que el cepillo o hisopo fue guardado sin permitir su secado. Debido a que la obtención de ADN de calidad para la detección depende mucho del tipo de instrumento, de la técnica de recolección y de su conservación, es necesario unificar los criterios de toma de muestra en hombres, para obtener muestras de alta calidad.

En cuanto a la edad y presencia de VPH oncogénico, se compararon individualmente los diferentes grupos con la presencia de VPH oncogénico y no oncogénico y se encontró una relación significativa entre el rango de edad 20 a 26 años y la infección por VPH oncogénico ( $\text{Chi} = 4.000$ ,  $P=0,05$ ) este rango de edad se supone que comprende el grupo con comportamiento sexual riesgoso, es decir, cambio frecuente de pareja o mayor promiscuidad, lo cual justifica que sea un grupo de riesgo para la infección con VPH oncogénico.

Con respecto al sitio anatómico y su relación con la presencia de VPH, en un estudio realizado con muestras ano-genitales de hombres de Estados Unidos, Brasil y México, se encontró que la tasa de positividad total fue de 65,2 %, con el 12 % de tipos oncogénicos y 20,7 % de tipos no oncogénicos (9). En nuestra población aunque la tasa de positividad obtenida fue un poco más baja (49,9 %), el porcentaje de cepas oncogénicas entre los positivos fue muy alta (46,2 %). El hecho de que los hombres de nuestra población sean portadores de cepas oncogénicas en mayor porcentaje, puede explicar en parte por qué se tiene también una tasa alta de cáncer cervical en nuestra población femenina. En ese estudio, el porcentaje de prevalencia de VPH fue mayor en Brasil (72,3 %) que en México y EE.UU que fueron similares (61,9 % y 61,3 % respectivamente). En estos países VPH16 (6,5 %), VPH51 (5,3 %) y VPH59 (5,3 %) fueron los tipos oncogénicos más comúnmente detectados y los no oncogénicos fueron VPH84 (7,7 %), VPH62 (7,3 %) y VPH6 (6,6 %) (9). En nuestra población, VPH16 y VPH18 tuvieron un porcentaje similar de 12 % y 11 % respectivamente, pero mayor de lo encontrado en Brasil (7,1 % VPH16; 3,1 % VPH18) país fronterizo con el nuestro y la población estudiada comprendió 382 participantes, hombres en edades entre los 18 y 70 años, que acudieron al servicio de urología, es decir, en este aspecto, una población similar a la nuestra. En otro estudio realizado en Chile en 2008, sobre 62 hombres, asintomáticos, la tasa de positividad fue muy alta, de 84 %, correspondiendo el 70 % a VPH de alto riesgo oncogénico, esto puede estar influenciado por el método de detección utilizado

en ese estudio (12).

Por otra parte, en nuestro estudio se encontró una relación significativa entre la muestra de la región anal y la presencia de VPH oncogénico, lo cual puede estar relacionado con la incidencia de cáncer anal en hombres y mujeres, este tipo de cáncer ubicado en la categoría de cáncer de colón, recto y ano, se encuentra como la sexta causa de muerte por cáncer en Venezuela (13).

En Brasil la tasa de incidencia y mortalidad por cáncer de cuello uterino es mucho menor que en Venezuela, (10,2 vs 16,8), de hecho, nuestro país pertenece a los países caribeños con las tasas más altas de incidencia y mortalidad de América Latina, en comparación con los países sudamericanos (14). Existen diferencias por región y aún dentro de los países, tales diferencias se deben principalmente al impacto de los programas de tamizaje o pesquisa, las tasas de natalidad y las desigualdades socioeconómicas. Por su parte, la alta tasa de positividad de VPH en hombres demostrada en nuestro estudio, puede jugar un importante papel en la transmisión de VPH de alto riesgo oncogénico entre la población femenina y contribuir importantemente con la incidencia del cáncer cervical en nuestro país.

## CONCLUSIONES

En este estudio el porcentaje de positividad de infección por VPH fue comparativamente menor que en otros países de la región, pero se observó una alta tasa de subtipos virales oncogénicos. Esto puede explicar la alta incidencia de cáncer cervical observada en nuestra población femenina. Asimismo, se encontró también una fuerte asociación entre VPH oncogénico y la región anal, lo cual permite señalar que la infección por VPH oncogénico en la región anal puede ser un factor de riesgo importante para el desarrollo de cáncer anal.

## REFERENCIAS

1. Zür-Hausen H. Papillomaviruses in Human Cancers. *Proc Assoc Am Physicians*. 1999;111(6):581-587.
2. Zür-Hausen H, Castellsague X, Ghaffari A, Daniel R, Bosch X, Muñoz N, et al. Prevalence of penile human papillomavirus DNA in husbands of women with and without cervical neoplasia: A study in Spain and Colombia. *J Infect Dis*. 1997;176:353-361.
3. Partridge J, Koutsky L. Genital human papillomavirus in men. *Lancet Infect Dis*. 2006;6:21-31.
4. Nicolau S, Camargo C, Stavale J, Castelo A, Dores G, Lorincz A, et al. Human papillomavirus DNA detection in male sexual partners of women with

- genital human papillomavirus infection. *Urology*. 2005;65:251–255.
5. Kaspersen MD, Larsen PB, Ingerslev HJ, Fedder J, Petersen GB, Bonde J, et al. Identification of Multiple HPV Types on Spermatozoa from Human Sperm Donors. *Plos one*. 2011;6(3):e18095.
  6. Muñoz N, Castellsague X, Bosch FX, Tafur L, de Sanjose S, Aristizabal N, et al. Difficulty in elucidating the male role in cervical. *Cancer in Colombia, a high-risk area for the disease*. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88(15):1068-7105.
  7. Gómez I, Gómez E, Conde S, Maganto E, Navío S, Allona A. Infección por Papillomavirus en el hombre. Estado actual. *Actas Urol Esp*. 2005;29(4):365-372.
  8. Dunne EF, Nielson CM, Stone KM, Markowitz LE, Giuliano AR. Prevalence of HPV infection among men: A systematic review of the literature. *J Infect Dis*. 2006;194:1044-1057.
  9. Giuliano AR, Lazcano-Ponce E, Villa LL, Flores R, Salmeron J, Lee J, et al. The Human Papillomavirus infection in men study: Human Papillomavirus prevalence and type distribution among men residing in Brazil, Mexico, and the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(8).
  10. Quintero M, Cruz J, Bastidas M, Marquez L, Puig J. Detección y tipificación de virus del papiloma humano (VPH) mediante PCR- RFLP. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 2008;68(1):25-31.
  11. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2ª edición. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
  12. Guzmán P, Ili C, Rifo P, Briceño G, Araya J, Villaseca M, et al. Prevalencia de la infección genital por virus papiloma humano en hombres universitarios voluntarios de la IX Región, Chile. *Rev Méd Chile*. 2008;136:1381-1389.
  13. Capote L. Aspectos epidemiológicos del cáncer en Venezuela. *Rev Venez Oncol, Caracas*, [Internet], 2006.[Consulta el 07 de julio de 2012]; Dic 18(4). Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S07980582200600040011&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S07980582200600040011&lng=es&nrm=iso).
  14. Almonte M, Muñoz N. Carga de cánceres asociados con el virus papiloma humano en América Latina. *Rev Per Ginecol Obstet*. 2007;53(2):93-97.

---

## Químicos ambientales dañan la salud reproductiva.

Obstetras y ginecólogos abogan por cambios de políticas para proteger la salud

23 de septiembre 2013

Los productos químicos tóxicos en el medio ambiente perjudican nuestra capacidad de reproducción, afectan negativamente a los embarazos, y están asociados con muchos otros problemas de salud a largo plazo, de acuerdo con el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (El Colegio) y la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM). En un Comité de Opinión conjunto, el Colegio y la ASRM solicitan que con urgencia los obstetras y ginecólogos aboguen por cambios en las políticas gubernamentales para identificar y reducir la exposición a los agentes ambientales tóxicos.

"Los legisladores deben exigir a la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. y la industria que definan y estimen los riesgos que la exposición a los productos químicos dañinos representan para las embarazadas, los rec y los niños y actuar para proteger a las poblaciones vulnerables", dijo Jeanne A. Conry, MD, PhD, presidenta de El Colegio.

"Todas las mujeres embarazadas en Estados Unidos están expuestas a muchos productos químicos diferentes en el medio ambiente", dijo la Dra. Conry. "La exposición prenatal a ciertas sustancias químicas está vinculada a abortos involuntarios, muertes fetales y defectos de nacimiento." Muchos productos químicos que las embarazadas ingieren o absorben del ambiente pueden atravesar la placenta y llegan al feto. La exposición al mercurio durante el embarazo, por ejemplo, se sabe puede dañar el desarrollo cognitivo en los niños.

La evidencia científica en los últimos 15 años muestra que la exposición a los agentes ambientales tóxicos antes de la concepción y durante el embarazo puede tener efectos significativos y duraderos en la salud reproductiva. "Por ejemplo, la exposición a plaguicidas en los hombres se asocia con una mala calidad del semen, esterilidad y cáncer de próstata", dijo Linda C. Giudice, MD, PhD, presidenta de la ASRM. "También sabemos que la exposición a los pesticidas puede interferir con la pubertad, la menstruación y la ovulación, la fertilidad y la menopausia en las mujeres."

*Continúa en pág. 267*