

ESTUDIO CONTROLADO DE CASOS DE CANCER CERVICOUTERINO E INFECCION CON EL VIRUS PAPILOMA HUMANO EN AMERICA LATINA*

Lic. María M. Brenes¹, Lic. Suzanne Loo de Lao¹, Lic. Basilio Gómez¹, Dr. William C. Reeves¹, y Grupo Multinacional de Estudio del Cáncer Cérvicouterino en América Latina²

De la División de Epidemiología del Laboratorio Conmemorativo Gorgas¹ y del Grupo Multinacional de Estudio que está integrado por la Dra. Rosa C. de Britton y Dra. Idalmis de Torraza, de Panamá; Dr. Eduardo Gaitán, de Colombia; Dr. Eugenio Morice, de Costa Rica; Dr. Francisco Tenorio, de México; Dra. Louise Brinton, Dr. Robert Kurman, y Lic. Patricia Montalván, de E.U.A.; Dr. William Rawls, y Lic. Deoraj Causay, de Canadá²

Se cree que los virus del papiloma humano (VPH) 16 y 18 son factores de riesgo para las displasias y neoplasias de la cervix uterina. Sin embargo, la mayoría de los estudios no han sido controlados y se hicieron por observación, en poblaciones de bajo riesgo para cáncer de la cervix uterina. Se informa aquí la fase piloto de un estudio controlado de cáncer invasor de la cervix uterina efectuado en Panamá y Costa Rica, a nivel nacional, y en la ciudad de Bogotá, Colombia, de julio a septiembre de 1985. Incluimos 46 casos nuevos de cáncer de cervix y 51 controles, apareados por edad. Las participantes fueron entrevistadas y se tomaron muestras, para pruebas de detección del VPH y citopatología. La infección con VPH fue definida

por la técnica de hibridización in situ del ADN viral, en condiciones estrictas y no estrictas, para la determinación de los VPH tipos 6, 11, 16 y 18. En más casos (91%) que en controles (63%) se detectó el VPH (condiciones no estrictas) y en más casos (67%) que en los controles (43%) se detectó el VPH 16 ó 18. El 50% de los maridos eran positivos, con cualquier tipo de VPH, sin que hubiese diferencia significativa entre los maridos de los casos y los maridos de los controles. La edad de la primera relación sexual fue el factor de riesgo más significativo para la infección con VPH 16 ó 18 (16/18) en todas las participantes. El fumar se asoció significativamente con el cáncer de la cervix (52% de los casos vs 27% de los controles) pero no

* Presentado para publicación en junio de 1987.

se asoció con la infección con el VPH.

Se sabe que existen muchos tipos de Virus Papiloma Humano (VPH) y que varios de estos virus han sido asociados con lesiones, localizadas en diferentes sitios anatómicos (1). Los VPH 6, 11, 16 y 18 se encuentran entre los tipos que infectan el tracto genital; y con base en el hallazgo frecuente de las secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) del VPH 16 ó 18, en lesiones premalignas y malignas, se les ha señalado como factores de riesgo para la neoplasia de la cervix uterina (2). Se pueden detectar secuencias de ADN del VPH en células raspadas de la superficie de las mucosas, permitiendo así la determinación fácil de la infección en controles normales, así como en mujeres con cáncer invasor de la cervix (3, 4). Estamos llevando a cabo un estudio de casos y controles, para determinar los factores de riesgo del cáncer invasor de la cervix en América Latina; en este estudio se recogen los especímenes para determinar las secuencias de ADN de los virus VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18.

Presentamos aquí los resultados de la fase piloto de este estudio, llevada a cabo en las ciudades de Bogotá, Colombia y en Panamá y en Costa Rica, a nivel nacional. Esta fase piloto tam-

bién se llevó a cabo en México, D.F.; sin embargo, el sismo de septiembre de 1985 destruyó las muestras biológicas e imposibilitó su análisis.

Materiales y métodos

Población en estudio. En cada uno de los centros participantes se identificaron las mujeres, entre 18 y 69 años de edad, con diagnóstico de cáncer invasor de la cervix y que no habían recibido tratamiento. Todos los diagnósticos se confirmaron histopatológicamente. Por cada caso de cáncer de la cervix uterina se tomaron al azar 2 controles, apareados por grupo de edad de 5 años. En Panamá y en Costa Rica se seleccionó un control hospitalario y un control en la comunidad de residencia del caso. En Bogotá, ambos controles fueron seleccionados de los hospitales generales.

Los controles hospitalarios se tomaron al azar, de la lista de pacientes admitidas por condiciones no ginecológicas. No se consideraron elegibles como controles las pacientes admitidas por problemas relacionados con el fumar o con trastornos endocrinos. Los controles de la comunidad se seleccionaron al azar, de la lista de pacientes adscritos a los centros de salud a los cuales pertenecía el caso. Se consideraron no elegibles como controles las señoras con antecedentes de cáncer o de his-

terectomía. Sólo en estas situaciones los controles fueron reemplazados.

Aunque el protocolo del estudio especifica 2 controles para cada caso, en este trabajo se presenta la información de 46 casos y de 51 controles. La fase piloto se dió por terminada en una fecha específica, cuando no todos los controles habían sido identificados e incluidos en el estudio. Los resultados de los controles de la comunidad y de los hospitalarios fueron similares respecto a la mayoría de las variables, por lo que ambos se presentan combinados en el análisis.

Se incluyeron los maridos, esposos o compañeros de las participantes monógamas. Se definió como monogamia el haber tenido en toda su vida un sólo compañero sexual.

Recopilación de información. A cada participante se le hizo una entrevista, para obtener información demográfica y epidemiológica. Se recogieron especímenes biológicos de la siguiente manera: a los casos, se les tomó un hisopado de la endocervix; a los controles, un hisopado del endocervix y un frotis, para el estudio de la citología exfoliativa; y a los maridos, un hisopado del surco balanoprepucial.

Detección de las secuencias de ADN del VPH. Las muestras se transfirieron a tubos con 2

ml. de solución amortiguadora de fosfato en salina y antibiótico; se les mantuvo en congelación a -20°C , hasta el momento de correr la prueba. La detección de la secuencia de ADN del VPH se hizo con la técnica de hibridación in situ en filtro, en papeles de nitrocelulosa (3, 5). Las pruebas se realizaron en el Laboratorio Conmemorativo Gorgas, con la colaboración del Departamento de Virología Molecular e Inmunología de la Universidad de McMaster en Hamilton, Canadá.

Manejo de datos y análisis estadístico. Los resultados se procesaron y analizaron por medio de programas comerciales, en un sistema de microcomputadoras IBM-PC. Utilizamos el estimado del riesgo relativo o Desigualdad Relativa (D.R.), para medir asociaciones y evaluar el efecto de la exposición a los factores de riesgo; las pruebas de Chi cuadrado y de exactitud de Fisher, de significación estadística; y el análisis de regresión logística, para determinar la importancia combinada de los factores de riesgo identificados en los análisis de una variable (6).

Resultados

Bajo condiciones de hibridación no estrictas, se detectó el ADN del VPH en 91% de los casos de cáncer de la cervix

y en 63% de los controles (Tabla No. 1). El 50% de los maridos dió un resultado positivo para cualquier tipo del VPH. No se encontró diferencia significativa entre los maridos de casos y los maridos de los controles.

La prevalencia de la infección con el VPH 16/18 fue significativamente más alta en los casos (67%) que en los controles (43%). El 35% de los maridos dió resultado positivo, sin diferencia significativa entre los

TABLA No. 1

ESTUDIO DEL VPH EN CASOS, CONTROLES Y MARIDOS EFECTUADO EN PANAMA, COSTA RICA Y BOGOTA, EN 1985

	CASO n=46		CONTROL n=51		MARIDO CASO n=9		MARIDO CONTROL n=17	
	NC+DNA	%+	NC+	%+	NC+	%+	NC+	%+
ALGUN VPH *	42	91	32	63	5	56	8	47
PANAMA	16/19	84	9/17	53				
COSTA RICA	13/13	100	14/20	70				
BOGOTA	13/14	93	9/14	64				
VPH-16/18 **	31	67	22	43	3	33	6	35
PANAMA	7	37	3	18				
COSTA RICA	12	92	10	50				
BOGOTA	12	86	9	64				
VPH-6/11 ***	9	20	7	14	1	11	3	18
PANAMA	7	37	4	24				
COSTA RICA	1	8	3	15				
BOGOTA	1	7	0	00				

* SE REFIERE AL ADN DEL VPH DETECTADO EN ALGUNA DE LAS TRES PRUEBAS EFECTUADAS EN CONDICIONES NO ESTRICTAS (VPH 16, VPH 18, VPH 6/11).

CASOS VS CONTROLES CHI CUADRADO 9.4 p= .002
D.R. 6.2
95% I.C. 1.8 - 34.2

** SE REFIERE A LAS PRUEBAS POSITIVAS, EN CONDICIONES ESTRICTAS PARA CADA TIPO, INDEPENDIEMENTE DE LA INFECCION CON VPH 6/11.

CASOS VS CONTROLES CHI CUADRADO 4.8 p= .03
D.R. 2.7
95% I.C. 1.1 - 6.8

***SE REFIERE A LAS PRUEBAS POSITIVAS CON VPH 6/11, EN CONDICIONES ESTRICTAS O NO ESTRICTAS; Y A LAS NEGATIVAS CON VPH 16/18, EN CONDICIONES ESTRICTAS.

NC = NUMERO DE CASOS.

maridos de casos y los maridos de los controles. La infección del VPH 16/18 fue la causa de la reacción observada bajo condiciones no estrictas de hibridización, en los casos y en los controles de Costa Rica y de Bogotá. Sin embargo, sólo el 37% de los casos y el 18% de los controles de Panamá mostraron infección con el VPH 16/18. Es interesante anotar que el VPH 16/18 fue detectado en 54% de los controles hospitalarios y solamente en el 19% de los controles de la comunidad.

La distribución de los factores de riesgo en relación con la infección con el VPH se analizó separadamente, por área geográfica. Como las relaciones son similares en todas las áreas, la información se presenta en este trabajo como una sola. Los casos de cáncer difieren de los

controles respecto a las variables asociadas comúnmente con el cáncer de la cervix (Tabla No. 2). Un porcentaje mayor de casos que de controles no había recibido educación; y entre los que recibieron educación, solo el 22% de los casos había terminado el segundo grado, en comparación con el 28% de los controles. El 53% de los casos inició su vida sexual activa alrededor de los 16 años de edad, mientras que eso sucedió solamente en el 34% de los controles. El 64% de los casos tuvo más de un compañero sexual, en comparación con el 47% de los controles. El 52% de los casos tenía historia de fumar en comparación con el 27% de los controles. El antecedente de citología vaginal fue menos frecuente en los casos (58%) que en los controles (69%).

TABLA No. 2

DISTRIBUCIÓN DE LOS FACTORES DE RIESGO EN CASOS Y CONTROLES

ATRIBUTO	CASOS	%	CONTROLES	%	D.R.
HISTORIA DE FUMAR *	24/46	52	14/51	27	2.88
COMIENZO DE ACTIVIDAD SEXUAL A LOS 16 O MENOS AÑOS DE EDAD **	24/45	53	17/50	34	2.22

En los casos, los promedios de infección con el VPH 16/18 fueron similares en todos los grupos de edad, mientras que en los controles estas tasas aumentaron con la edad (Tabla No. 3).

TABLA No. 3

VPH 16/18 EN CASOS Y EN CONTROLES

EDAD	CASOS	%	CONTROL	%	D.R.
-30	5/8	62	1/9	22	5.8
30/49	9/16	56	7/16	44	1.6
+50	15/20	75	13/23	56	2.3

% = PORCENTAJE
DR = DESIGUALDAD RELATIVA
EL NUMERADOR INDICA EL NUMERO DE POSITIVOS. EL DENOMINADOR, EL NUMERO DE PERSONAS EXAMINADAS

Es así, que el riesgo mayor se observó entre las mujeres jóvenes, entre las que era casi 3 veces mayor.

Se hizo el análisis de regresión logística, incluyendo los factores que fueron significativos en los análisis de una variable, como el fumar, la infección por el VPH, la edad del comienzo de la vida sexual, y el número de compañeros sexuales. Sólo la infección con el VPH 16/18 y la edad de comienzo de la vida sexual a los 16 años o menos, aparecieron como factores de riesgo para el cáncer cérvico-uterino (Tabla No. 4).

Las citologías que se tomaron a los controles fueron leídas en el Depto. de Patología del Instituto Oncológico Nacional de

TABLA No. 4
DESIGUALDAD RELATIVA ESTIMADA DEL ANALISIS DE REGRESION LOGISTICA

	VPH 16/18	EDAD DE COMIENZO DE VIDA SEXUAL ACTIVA
D.R.	2.67	2.16
95% I.C.	1.07-6.70	0.96 - 5.80

D.R. = DESIGUALDAD RELATIVA
I.C. = INTERVALO DE CONFIDENCIA

Panamá y en el Depto. de Patología de la Universidad de Georgetown, E.U.A. Se leyeron 48 laminillas de controles, ya que 3 resultaron destruidas en el transporte. Se hizo la lectura ciega, es decir, sin conocer los resultados de las pruebas de hibridización. El 19% de las citologías fueron interpretadas como normales, 42% como procesos inflamatorios, 21% condilomas, 10% displasias y un 8% sin interpretación (Tabla No. 5). Es interesante anotar

TABLA No. 5

INFECCION CON VPH E INTERPRETACION CITOLOGICA DE LOS CONTROLES

	%	NEG NC	%	POS NC	POS % 16/18	
NORMAL	19	6	67	3	33	33%
INFLAMACION	42	7	35	13	65	35%
CONDILOMA	21	2	20	8	80	60%
DISPLASIA	10	1	20	4	80	80%
NO INTERPRETACION	8	1	25	3	75	25%

NEG = NEGATIVO POS = POSITIVO
NC = NUMERO CASOS
% = PORCENTAJE

que sólo un 19% de esta población de controles tenía citología normal, mientras que un 42% tenía proceso inflamatorio. Se detectó el VPH 16/18 en el 60% de los condilomas y en el 60% de las displasias. En el 35% de los procesos inflamatorios y en el 33% de las citologías normales se detectó el VPH 16/18, sin que se encontraran cambios citopáticos sugestivos de infección o de enfermedad.

Comentarios

Desde 1983, diversos estudios han demostrado la infección con el VPH, en lesiones preinvasoras e invasoras, localizadas en la cervix uterina (7 a 10). Sin embargo, la mayoría de los estudios han incluido un número pequeño de pacientes y los resultados en la frecuencia de la infección fueron muy variados. Además, ninguno de esos estudios incluyó controles rigurosamente seleccionados, por lo que la asociación entre la infección con el VPH y el cáncer de la cervix no fue muy bien definida.

En este estudio utilizamos la hibridación *in situ* en filtro para definir la infección con el VPH en los casos de cáncer, en sus controles pareados y en los maridos. Este método es muy adecuado, cuando se trata de probar números grandes de especímenes y facilita el muestreo de controles normales. Nuestros

resultados confirman una asociación significativa entre la infección con el VPH 16 y 18 y el cáncer de la cervix uterina. Nuestros resultados reafirman el concepto de la variación geográfica de los VPH y el cáncer de la cervix.

Una proporción alta de controles aparecen infectados con el VPH. El 63% de los controles estaba infectado con alguno de los tipos del VPH, en condiciones de hibridación no estricta. En condiciones estrictas se demostró el VPH 16/18 en 43% de los controles. Aunque estas cifras son altas, si las comparamos con los promedios descritos por otros autores, hay muchas razones para creer que ellas reflejan correctamente la tasa de infección con el VPH en mujeres normales, en las 3 áreas estudiadas. Primero, el promedio de infección con el VPH varió tanto en los casos como en los controles. Segundo, otros agentes virales de transmisión sexual prevalecían más en las poblaciones con cifras altas de cáncer de la cervix (11). La edad aparece como el principal factor de riesgo para la infección con el VPH en los controles. En nuestro estudio, la mayoría de la población estaba compuesta de mujeres adultas. Las tasas bajas, que se observaron en mujeres jóvenes, son similares a las observadas en otros estudios (12).

Además de la infección con el

VPH 16/18, los casos y los controles difieren significativamente en relación con los factores de riesgo clásicos, asociados al cáncer de la cervix uterina (11, 13). Los análisis de regresión logística demostraron que el único efecto modificador de la infección con el VPH, que se detectó en este estudio, fue la edad. La infección con el VPH 16/18 aparece como el factor de riesgo más importante, seguido por la edad del inicio de la vida sexual; ni el fumar, ni el número de compañeros sexuales contribuyeron significativamente, como factores de riesgo del cáncer de la cervix, en este estudio piloto.

Nuestros resultados sugieren además promedios altos de prevalencia del VPH 16 ó 18 en las poblaciones estudiadas de América Latina. Las tasas de prevalencia específica por edad, observadas entre los controles, son compatibles con aquellas de otros agentes virales que establecen infecciones persistentes y por consiguiente que las tasas se acumulan con la edad (11). Esta información sugiere también que las mujeres con cáncer en la cervix uterina se infectan a una edad más temprana que las mujeres sin cáncer. La información presentada sustenta el papel etiológico del VPH en el cáncer de la cervix uterina. Es necesario, para aclarar estos resultados, el mejor conocimiento de la historia natural de la infección geni-

tal con el VPH y de su interacción con otros factores de riesgo del cáncer en la cervix.

SUMMARY

Human papillomavirus (HPV) types 16 and 18 have been implicated as risk factors for dysplasia and neoplasia of the cervix. However, most studies have been observational, uncontrolled and conducted in populations at low risk for invasive cancer. We report the pretest phase of a control study of incident invasive cancer of the cervix in Panama, Costa Rica and Bogota, Colombia. Between July and September 1985 we enrolled 46 cases diagnosed invasive cancer of the cervix and 51 age matched controls. Subjects were interviewed and samples collected for HPV DNA assays and cytopathology. HPV infection was defined by a filter in situ DNA hybridization technique under nonstringent and stringent conditions against HPV types 6, 11, 16 and 18. More cases (91%) than controls (63%) had HPV detected (nonstringent) and more cases than controls had HPV 16 or 18 (67% vs 43%). 50% of the spouses were positive for any type of HPV with no significant difference between case spouses and control spouses. Age at first intercourse was the most significant risk factor for HPV 16/18 infection in all subjects.

Smoking was significantly associated with cancer of the cervix (52% of cases vs 27% controls) but was not associated with HPV infection.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pfister H: Biology and biochemistry of papillomaviruses. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 99:111-181, 1984
2. Gissmann L, Schneider A: Human papillomavirus DNA in preneoplastic and neoplastic genital lesions, en *Viral etiology of cervical cancer*, ed por R Peto y H zur Hausen, Banbury Report 21, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1986.
3. Wagner D, Ikenberg H, Boehm N, Gissmann L: Identification of human papillomavirus in cervical swabs by deoxyribonucleic acid in situ hybridization. *Obstet. Gynecol* 64 (6):767-772, 1984
4. Schneider A*, Kraus H, Schruhmann R, Gissmann L: Papillomavirus infection of the lower genital tract: detection of viral DNA in gynecological swabs. *Int J Cancer* 35(4):443-448, 1985
5. Reeves WC, Cauby D, Brinton L, Brenes MM, Montalvan P, Gómez B, Britton RC, Morica E, Gaitán E, Lao SL, Rawls WE: Case Control Study of Human Papillomaviruses and Cervical Cancer in Latin America. *Int J Cancer* (in press).
6. Cox DR: *Analysis of binary data*, London, Methuen, 1970
7. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H: A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 80 (12):3812-3815, 1983
8. Prakash SS, Reeves WC, Sisson GR, Brenes M, Godoy J, Bacchetti S, de Britton RC, Rawls WE: Herpes simplex virus type 2 and human papillomavirus type 16 in cervicitis dysplasia and invasive cervical carcinoma. *Int J Cancer* 35(1):51-57, 1985
9. McCance DJ, Campio MJ, Clarkson PK, Chesters PM, Jenkins D, Singer A: Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of the cervix. *Br J Obstet Gynecol* 92 (11):1101-1105, 1985
10. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H: A new type of papillomavirus DNA its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 3(5):1151-1157, 1984
11. Rawls WE, Lavery C, Marrett LD, Clarke EA, Adam E, Melnick JL, Best JM, Kraiselburd E, Benedet LJ, Brenes MM, Quiroz E, Reeves WC: Comparison of risk factors for cervical cancer in different populations. *Int J Cancer* 37 (4):537-546, 1986
12. Schneider A, Holtz M, Gissmann L: Prevalence of genital HPV infections in pregnant women, en *International Workshop on Papillomaviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1986, p 41
13. Rotkin ID: A comparison review of key epidemiological studies in cervical cancer related to current searches for transmissible agents. *Cancer Res* 33 (16):1353-1367, 1973