

Infección por virus de Epstein-Barr, citomegalovirus y virus de papiloma humano en mujeres de Chiapas, México

Sánchez González, Roberto A.¹ Ordóñez García, Jorge A.³
 Domínguez Arrevillaga, Sergio¹ Domínguez Espinoza, Sergio⁴
 Reyes Torres, Mauricio J.² Trujillo Vizuet, María G.¹
 Sepúlveda Delgado, Jesús¹

Epstein-Barr virus, cytomegalovirus and human papilloma virus infection in women from Chiapas, Mexico

Fecha de aceptación: abril 2023

Resumen

OBJETIVO. Determinar la frecuencia de infección del virus de Epstein-Barr (VEB), citomegalovirus (CMV) y virus de papiloma humano (VPH) a través de la técnica de RT-PCR en muestras cervicales de pacientes atendidas en un hospital de tercer nivel de atención en Chiapas.

MATERIALES Y MÉTODOS. Se desarrolló un estudio descriptivo, transversal y prospectivo. Mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia, se recolectó un total de 104 muestras, 89 cumplieron los criterios de inclusión. Se utilizó un cuestionario con variables de interés, a las participantes se les solicitó un consentimiento informado; posteriormente, a cada paciente que aceptó, un médico ginecólogo le tomó una muestra cervical. El análisis estadístico aplicado fue descriptivo. La extracción de ADN fue por estuche comercial, la calidad se verificó por PCR punto final y electroforesis en gel de agarosa; la detección de los virus fue por PCR en tiempo real (RT-PCR), utilizando ensayos específicos para cada virus con los respectivos controles de reacción.

RESULTADOS. La media de edad fue de 47.18 ± 12.04 años, 48.3% (n = 43) eran casadas, se encontró 78% (n = 69) positivas a presencia de ADN viral; la mayor frecuencia fue por VPH con 46.1% (n = 41). Se observó coinfección de VPH con CMV y/o VEB de 27% (n = 24).

CONCLUSIONES. Las infecciones virales juegan un papel importante en la génesis del cáncer cervicouterino, diversos estudios han encontrado integración genómica de virus como VPH, VEB, entre otros, en las células del cuello uterino, lo cual provoca el desencadenamiento de procesos ontogénicos. Identificar la infección con estos virus da la pauta para el manejo y seguimiento de las pacientes con lesiones en el cérvix.

Palabras clave: *virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, virus de papiloma humano.*

Abstract

OBJECTIVE. To determine the frequency of infection of Epstein-Barr virus (EBV), cytomegalovirus (HCMV) and human papillomavirus (HPV) through the RT-PCR technique in cervical samples from patients treated in a tertiary care hospital in Chiapas.

MATERIALS AND METHODS. A descriptive, cross-sectional and prospective study was developed. Through convenience non-probability sampling, a total of 104 samples were collected, 89 of which met the inclusion criteria. A questionnaire with variables of interest was used, an informed consent was obtained. To each patient who accepted, a cervical sample was taken by a gynecologist. The statistical analysis applied was descriptive. DNA extraction was by commercial kit, quality was verified by endpoint PCR and agarose gel electrophoresis; the detection of the viruses was by real-time PCR (RT-PCR), using specific assays for each virus with the respective reaction controls.

RESULTS. The mean age was 47.18 (±12.04) years, 48.3% (n = 43) were married, 78% (n = 69) were found to be positive for the presence of viral DNA; the highest frequency was due to HPV with 46.1% (n = 41). HPV coinfection with HCMV and/or EBV was found in 27% (n = 24).

CONCLUSIONS. Viral infections play an important role in the genesis of cervical cancer, several studies have found genomic integration of viruses such as: HPV, EBV, among others in the cells of the cervix, causing the triggering of oncogenic processes. Identifying the infection with these viruses provides guidelines for the management and monitoring of the patient with lesions in the cervix.

Keywords: *Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, human papillomavirus.*

¹Laboratorio de Investigación, Hospital Regional de Alta Especialidad Ciudad Salud, Tapachula, Chiapas, México

²Laboratorio de Investigación, Hospital Regional de Alta Especialidad Ciudad Salud, Tapachula, Chiapas, México. Red Mexicana de Investigación Clínica Enfermedades Infecciosas Emergentes

³Servicio de Ginecología y Obstetricia, ISSSTE, Tapachula, Chiapas, México

⁴Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, y Hospital Universitario Dr. José E. González, Monterrey, N.L., México

Correspondencia: Dra. María Guadalupe Trujillo Vizuet Carretera Puerto Madero s/n km 15200, Col. Los Toros, Puerto Madero, C.P. 30830, Tapachula, Chiapas, México

Dirección electrónica: vizuet16@hotmail.com
 Teléfono: 96 2620 1100, ext. 10122

Introducción

En todo el mundo, el cáncer cervicouterino ocupa el cuarto lugar entre los más comunes que afectan a la población femenina y es una de las principales causas de muerte en dicho grupo,³ tiene una mayor prevalencia que el cáncer de mama (2.1 millones de casos), el cáncer colorrectal (0.8 millones) y el cáncer de pulmón (0.7 millones).¹ En el año 2020 se reportaron 604 mil nuevos casos de cáncer cervicouterino y 342 mil muertes.² En lo que va del año 2022, en Estados Unidos se ha reportado un estimado de 14 100 casos nuevos y un cálculo de 4 280 muertes por cáncer cervicouterino.

En los países desarrollados de Occidente la incidencia del cáncer ha disminuido, esto se debe a un cambio en el estilo de vida de la población femenina, así como a una mejoría en la detección y tratamiento del mismo. En cambio, en países en vías de desarrollo y de bajos ingresos se ha registrado un aumento tanto de casos nuevos como de mortalidad. En estos países se observa una afectación por agentes infecciosos relacionados con el cáncer cervicouterino, y además cuentan con pocos recursos materiales y financieros para programas de detección.⁴

El desarrollo del cáncer cervicouterino está asociado a diversos factores de riesgo, como la infección por el VPH, la edad, tabaquismo, una mala alimentación, uso de anticonceptivos orales y el parto. Una infección crónica por VPH del tipo de alto riesgo es el principal factor de riesgo para desarrollar neoplasia.³ Existen de 30 a 40 genotipos de VPH que infectan el tracto anogenital, de los cuales 13 son de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 56, 59 y 68). Los más agresivos son los tipos 16 y 18, la infección tiende a persistir y esto conlleva a que se integre con el genoma del hospedador causando una neoplasia cervical. En todo el mundo, 70% de los casos de cáncer cervicouterino están relacionados con VPH de alto riesgo.⁵

Gran parte de las infecciones con VPH no conducen a una patología cervical. Se considera que se requiere la coinfección con otros virus que son de transmisión sexual como cofactor adicional en la infección cervical con VPH para una evolución a cáncer cervical. Estudios anteriores encontraron que el virus de herpes simple (VHS), CMV, VEB y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) podrían ser cofactores de la carcinogénesis asociada al VPH.⁶

El objetivo del presente estudio fue determinar la frecuencia de infección del VEB, el CMV y el VPH a través de la técnica de RT-PCR en muestras cervicales de pacientes atendidas en el Hospital Regional de Alta Especialidad Ciudad Salud.

Metodología

Se desarrolló un estudio descriptivo, transversal y prospectivo aprobado por el comité de investigación, ética en investigación y bioseguridad del Hospital Regional de Alta Especialidad Ciudad Salud.

Previa obtención de muestras biológicas, se aplicó un consentimiento informado con base en las consideraciones éticas, se utilizó un cuestionario con variables de interés, y el médico ginecólogo obtuvo un raspado cervical

utilizando material nuevo y estéril, el cepillo se colocó en medio de transporte digene[®] HC2 DNA Collection Device; las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento. Se obtuvieron 104 muestras de mujeres que acudieron al Servicio de Ginecología, 89 muestras cumplieron con la calidad e integridad deseada para posteriormente procesar por RT-PCR.

La extracción del material genético se hizo a partir de células contenidas en el cepillo utilizando el estuche QIAamp/DNA/Minikit[®] (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se cuantificó el ADN usando el fluorómetro Quantus[™] Fluorometer (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), la lectura se realizó con 2 μ L de muestra. Se verificó la calidad del ADN para PCR amplificando un fragmento del gen β -globina.⁷

La detección del VPH se hizo mediante RT-PCR, usando el estuche QuantiNova[™] SYBR[®] Green PCR (Qiagen, Hilden, Alemania) empleando los primers consenso MY09/MY11⁸ de acuerdo con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C 15 seg, 55 °C 30 seg y 72 °C 30 seg, una curva de fusión a 95 °C 15 seg, 60 °C 1 min y 95 °C 15 seg con un aumento de 0.5 °C por segundo para evaluar la longitud de amplificación; CMV y VEB se realizó mediante sondas TaqMan;^{9,10} todas las reacciones se llevaron a cabo con un volumen final de 25 μ L y con las siguientes condiciones TaqMan Universal PCR Master Mix[™] 2X (Applied biosystems, Woolston, Warrington, GB) 800 nm de cada primer, 400 nm de la sonda específica, en cada corrida se usó un control negativo y un control positivo (REALQUALITY RQ-CMV STANDARD y AmpliRun[®] Total EBV control Vircell, respectivamente). La mezcla de reacción contenía 5 μ L de ADN extraído, la amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C 15 seg y 60 °C 1 min. Se consideraron positivas las muestras con un valor de $CT \leq 37.00$.

Análisis estadístico

La base de datos con las variables de interés se analizó mediante una estadística descriptiva, se utilizó el programa estadístico IBM SPSS versión 23.0, la representación de las variables cualitativas fue por frecuencia y porcentajes, y las variables cuantitativas con media y desviación estándar.

Resultados

Entre las características sociodemográficas de las participantes se encontró que la media de edad de las participantes fue de 47.1 ± 12.04 años, el estado civil de 48.3% (n = 43) fue casadas, 53.9% (n = 48) con nivel máximo de escolaridad primaria, 89.9% (n = 80) con ocupación ama de casa y la región de origen del 55.1% (n = 49) fue el Soco-nusco (cuadro 1).

Entre las características ginecobstétricas, 64% (n = 57) no cuenta con antecedentes patológicos, 68.5% (n = 61) mencionó no tener antecedentes no patológicos, 92.1% (n = 82) comentó haber tenido la menarca en el rango de

11 a 15 años, 60.7% (n = 54) dijo haber tenido el inicio de vida sexual activa en el rango de edad de 16 a 20 años. Con respecto al número de gestas, 21.3% (n = 19) mencionó tres gestas; de las cuales 19.1% (n = 17) tuvo dos partos, 13.5% (n = 12) comentó haber tenido un aborto, 18% (n = 16) tuvo una cesárea. Acerca del uso de métodos anticonceptivos, 64% (n = 57) no había usado; en cuanto al número de parejas sexuales, 66.3% (n = 59) comentó sólo una pareja sexual (cuadro 2).

Cuadro 1.
Características sociodemográficas de las participantes

Variables	Frecuencia	%
Estado civil		
Unión libre	24	27
Casada	43	48.3
Viuda	8	9
Soltera	14	15.7
Escolaridad		
Analfabeta	15	16.9
Primaria	48	53.9
Secundaria	16	18
Preparatoria	8	9.0
Licenciatura	2	2.2
Ocupación		
Ama de casa	80	89.9
Desempleada	3	3.4
Comerciante	5	5.6
Empleada	1	1.1
Región de origen		
Metropolitana	2	2.2
Valles Zoque	3	3.4
Mezcalapa	1	1.1
De Los Llanos	1	1.1
Istmo-Costa	12	13.6
Oaxaca	1	1.1
La Frailesca	2	2.2
De Los Bosques	4	4.5
Soconusco	49	55.1
Sierra Mariscal	7	7.9
Selva Lacandona	1	1.1
Meseta Comiteca	6	6.7

Cuadro 2.
Características ginecoobstétricas de las participantes

Variables	Frecuencia	%
Antecedentes patológicos		
Sí	32	36
No	57	64
Antecedentes no patológicos		
Sí	28	31.5
No	61	68.5
Edad menarca		
≤ 10 años	3	3.4
11-15 años	82	92.1
≥ 16 años	4	4.5
IVSA		
11-15 años	18	20.2
16-20 años	54	60.7
21-25 años	11	12.4
≥ 26 años	6	6.7
Gestas		
0	8	9
1	9	10.1
2	13	14.6
3	19	21.3
4	13	14.6
5	11	12.4
≥ 6	16	18
Partos		
0	19	21.3
1	9	10.1
2	17	19.1
3	11	12.4
4	13	14.6
5	7	7.9
≥ 6	13	14.6
Abortos		
0	69	77.5
1	12	13.5
2	8	9
Cesárea		
0	67	75.3
1	16	18
2	2	2.2
3	3	3.4
4	1	1.1
Métodos anticonceptivos		
Sí	32	36
No	57	64
Parejas sexuales		
1	59	66.3
2	18	20.3
3	9	10.1
4	1	1.1
≥ 5	2	2.2

Se detectó ADN de VEB, CMV y VPH en 78% (n = 69) de las muestras en algunos casos en coinfección, no se encontró presencia de ADN en 22% (n = 20) (figura 1).

Se observó la presencia de ADN de VPH en 46.1% (n = 41), 23.6% (n = 21) tenía coinfección de VPH y VEB, 4.5% (n = 4) ADN de VEB, 2.2% (n = 2) coinfección de VPH y CMV, sólo 1.1% (n = 1) presentó coinfección con VEB, VPH y CMV (figura 2).

Figura 1.
Porcentaje de detección positiva y negativa de ADN de VEB, CMV y VPH

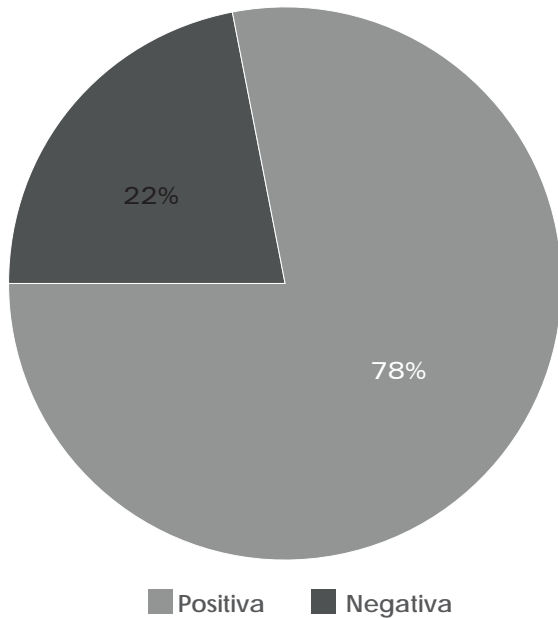
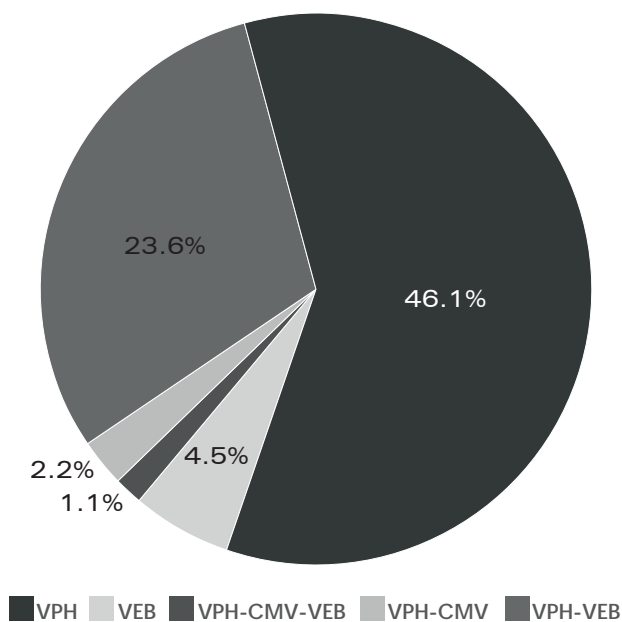


Figura 2.
Presencia de ADN de VPH, ADN de VEB y coinfección de VPH-VEB, VPH-CMV y VPH-VEB-CMV



Discusión

En estudios realizados en pacientes con cáncer o asintomáticas se ha observado presencia de ADN de VPH, VEB, CMV, entre otros. En 2016, Staykoba y colaboradores⁶ investigaron las infecciones virales cervicales en mujeres asintomáticas, y encontraron una prevalencia de infección con uno o más virus de 61.5% (n = 32), 32.7% (n = 17) fueron positivas para VPH, 9.6% (n = 5) y 5.8% (n = 3) fueron positivas para VEB y CMV, respectivamente. Comparado con nuestro estudio, se encontró una mayor prevalencia de infección viral de 78% (n = 69), VPH en 46.1% (n = 41), 23.6% (n = 21) tenía coinfección de VPH y VEB, 4.5% (n = 4) de VEB, 2.2% (n = 2) coinfección de VPH y CMV, y sólo 1.1% (n = 1) presentó coinfección con VEB, VPH y CMV; no se observó CMV en las muestras cervicales como sólo infección. Con respecto al rango de edad, en el estudio mencionado fue de 17 a 57 años, con una media de de 39 años; el rango de edad de nuestra investigación fue de 28 a 76 años, con una media de de 47 años. De la población estudiada, la mayoría de las mujeres (63.5%, n = 33) eran casadas, al igual que en el nuestro con 48.3% (n = 43).

Sin embargo, se ha investigado la posible asociación del VEB, el VPH y el VTMR con el desarrollo y la evolución del cáncer de mama. En un estudio realizado por Naushad y colaboradores en 2017¹¹ para investigar la posible asociación de la infección, analizaron 250 biopsias de tejido con cáncer de mama y encontraron una prevalencia de VEB en 24.4%, de VPH en 18.1% y de VTMR en 29.3%, los cuales son distintos a nuestros resultados, ya que nosotros observamos una mayor prevalencia de infección con VPH sobre VEB; mientras que la coinfección de VPH y VEB se detectó en 9.2% (n = 23), al igual que en nuestro estudio con una mayor prevalencia, coinfección de VPH y VTMR en 3.2% (n = 8) y coinfección de VEB y VTMR en el 6% (n = 15). Nuevamente, en este estudio se puede notar cómo la presencia de una infección de VEB y una coinfección de este mismo con VPH podría estar relacionada con el desarrollo de una oncogénesis en el cáncer de mama.

Por otro lado, en 2019 Putri y colaboradores¹² determinaron la prevalencia de la infección congénita por CMV en Yakarta, Indonesia: de un total de 411 neonatos obtuvieron como resultado una prevalencia de 5.8% (n = 24) de recién nacidos infectados por CMV; al comparar con nuestros resultados, se encontró una diferencia debido a que su población de estudio fue 4.6 veces mayor que nuestra población.

En otra investigación en cáncer de mama, en 2020 Golrokh y colaboradores¹³ realizaron un estudio para detectar la presencia de ADN de VEB. En 6.7% (n = 4) de las muestras de las pacientes se encontró ADN del VEB, las cuatro pacientes estaban en un alto grado de tumoración con respecto al resto y tenían un bajo nivel de educación. Aunque en 4.5% se observó ADN de VEB y en coinfección con VPH-VEB de 23.6%, se debe vigilar a la población de estudio debido al alto grado de tumoración que desencadena este virus. Sin embargo, en su estudio de 2020, Syeda y colaboradores¹⁴ hallaron la prevalencia de VEB, de CMV y de VPH en tejidos con cáncer oral de células escamosas obtenidas de 58 pacientes. Ninguna muestra resultó positiva para VPH. Se identificó VEB en 15 pacientes (25.86%) y CMV en tres

(5.17%); comparado con nuestros resultados, se encontró VPH en 41 pacientes (46.06%). La coinfección con uno o más virus se detectó en dos pacientes y fue una coinfección con CMV y VEB.

Agradecimientos: Nuestro reconocimiento a las pacientes que participaron en este proyecto.

Conflicto de intereses: Sin conflicto de intereses.

Financiamiento: Financiamiento institucional.

Conclusiones

Las infecciones virales juegan un papel importante en la génesis del cáncer cervicouterino, diversos estudios han encontrado integración genómica de virus como VPH, VEB, CMV, entre otros, en las células del cuello uterino, provocando el desencadenamiento de procesos ontogénicos. Identificar la infección con estos virus da la pauta para el manejo y seguimiento de las pacientes con lesiones en el cérvix.

Referencias

1. Buskwofie, A., David-West, G. y Clare, C.A., "A review of cervical cancer: incidence and disparities", *J Natl Med Assoc*, 2020, 112 (2): 229-232. DOI: 10.1016/j.jnma.2020.03.002. Epub, 8 de abril de 2020. PMID: 32278478. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32278478/>.
2. "Cáncer cervicouterino", s/f. Who.int. Recuperado el 29 de noviembre de 2022. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>.
3. Olusola, P., Banerjee, H.N., Phillely, J.V. y Dasgupta, S., "Human papilloma virus-associated cervical cancer and health disparities", *Cells*, 2019, 8 (6): 622. DOI: 10.3390/cells8060622. PMID: 31234354; PMCID: PMC6628030. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31234354/>.
4. "Cancer of the cervix uteri-cancer stat facts", SEER. Cita-do el 6 de octubre de 2022. Disponible en: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/cervix.html>.
5. Bhatla, N. y Singhal, S., "Primary HPV screening for cervical cancer", *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2020, 65: 98-108. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2020.02.008. Epub: 2 de marzo de 2020. PMID: 32291178. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32291178/>.
6. Staykova, J., Belovska, T., Murad, A., Kakid, S., Nacheva, A. y Shikova, E., "Cervical viral infections among asymptomatic Bulgarian women", *Cent Eur J Public Health*, 2016, 24 (3): 176-179. DOI: 10.21101/cejph.a4299. PMID: 27760284.
7. Adeyemi, O.O., Herod, M.R., Oladiji, F., Fakunle, Y.M., Babatunde, A.S. y Agbede, O.O., "A multi-template multiplex PCR assay for hepatitis B virus and human β -globin", *J Med Virol* [Internet], 2017, 89 (11): 1944-1951.
8. Draganov, P., Todorov, S., Todorov, I., Karchev, T. y Kalvatchev, Z., "Identification of HPV DNA in patients with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis using SYBR Green real-time PCR", *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2006, 70 (3): 469-473. DOI: 10.1016/j.ijporl.2005.07.018. Epub: 30 de Agosto de 2005. PMID: 16137771. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16137771/>.
9. Khoddami, M., Nadji, S.A., Dehghanian, P., Vahdatinia, M. y Shamshiri, A.R., "Detection of Epstein-Barr virus DNA in Langerhans cell yistiocytosis", *Jundishapur J Microbiol*, 2015, 8 (12): e27219. DOI: 10.5812/jjm.27219. PMID: 26870310; PMCID: PMC4746794. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4746794/>.
10. Gómez-Mora, E., Massanella, M., García, E., Giles, D., Bernadó, M., Urrea, V., Carrillo, J., Ouchi, D., Puig, J., Negredo, E., Clotet, B., Blanco, J. y Cabrera, C., "Elevated humoral response to cytomegalovirus in HIV-infected individuals with poor CD4+ T-cell immune recovery", *PLoS One*, 2017, 12 (9): e0184433. DOI: 10.1371/journal.pone.0184433. PMID: 28934217; PMCID: PMC5608209. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28934217/>.
11. Naushad, W., Surriya, O. y Sadia, H., "Prevalence of EBV, HPV and MMTV in Pakistani breast cancer patients: a possible etiological role of viruses in breast cancer", *Infect Genet Evol*, 2017, 54: 230-237. DOI: 10.1016/j.meegid.2017.07.010. Epub: 10 de julio de 2017. PMID: 28705719. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28705719/>.
12. Putri, N.D., Wiyatno, A., Dhenni, R., Sriyani, I.Y., Dewantari, A.K., Handryastuti, S. et al., "Birth prevalence and characteristics of congenital cytomegalovirus infection in an urban birth cohort, Jakarta, Indonesia", *Int J Infect Dis*, 2019, 86: 31-39. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31207385/>.
13. Golrokh Mofrad, M., Kazeminezhad, B. y Faghihloo, E., "Prevalence of Epstein-Barr virus (EBV) in Iranian breast carcinoma patients", *Asian Pac J Cancer Prev*, 2020, 21 (1): 133-137. DOI: 10.31557/APJCP.2020.21.1.133. PMID: 31983175; PMCID: PMC7294004. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31983175/>.
14. Naqvi, S.U., Khan, S., Ahmed, A., Lail, A., Gul, S. y Ahmed, S., "Prevalence of EBV, CMV, and HPV in oral squamous cell carcinoma patients in the Pakistani population", *J Med Virol*, 2020. DOI: 10.1002/jmv.25791. Epub disponible. PMID: 32219873. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32219873/>.