

Original

Subtipos de virus del papiloma humano y lesiones intraepiteliales e invasoras de cérvix uterino en mujeres de la provincia de Ciudad Real

A.M. Puig¹, P. Guerra², C. Martínez², R Cuesta³, C. Millana⁴ y J. Fariña⁴

1Servicio de Anatomía Patológica y 2Unidad de Investigación, Complejo Hospitalario de Ciudad Real; 3Centro de Proceso de Datos y 4Cátedra de Anatomía Patológica II, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid.

SUMMARY

Foreword: The oncogenic role of human Papillomavirus (HPV) in intraepithelial lesions of the uterine cervix has been largely described. Objective: To determine the different HPV DNA and their prevalence in patients with cytopathological lesions. Materials and Methods: The PAP smears of 6,300 women were diagnosed over a 2-year period. The presence of HPV DNA in all intraepithelial lesions, as well as in invasive squamous carcinoma, was detected by polymerase chain reaction (PCR). Results: HPV DNA was detected in 20% of low-grade lesions, in 73% of high-grade lesions and in 50% of invasive squamous carcinoma. The most frequent subtype found in low-grade lesions was "unclassified" HPV DNA 16 was found in high-grade lesions and in invasive squamous carcinoma. In four cases, more than one HPV subtype was found. Conclusions: The HPV found were similar to those described in our area. Rev Esp Patol 2001; 34(4): 311-315.

Key words: Papillomavirus - Polymerase chain reaction - Cervical intraepithelial neoplasia - Cervix uteri

RESUMEN

Introducción: El papel oncogénico del virus del papiloma humano (VPH) en las lesiones intraepiteliales de cérvix uterino se ha descrito en numerosas publicaciones. Objetivo: Conocer la prevalencia y los subtipos de infección por VPH en pacientes con lesiones citológicas. Material y métodos: Durante dos años se han diagnosticado las triples tomas citológicas de 6300 mujeres. En todas las lesiones intraepiteliales y carcinomas invasores se determinó la presencia de ADN vírico del VPH mediante reacción en cadena de polimerasa (RCP). Resultados: El VPH fue positivo en el 20% de las lesiones de bajo grado, en el 73% de las de alto grado y en el 50% de los carcinomas invasores. El subtipo más frecuente en lesiones de bajo grado fue "no tipado". El subtipo 16 se asoció a lesiones de alto grado y a carcinoma invasor. En cuatro ocasiones se aisló más de un subtipo de VPH. Conclusiones: Los subtipos de VPH aislados son similares a los descritos en nuestro medio. Rev Esp Patol 2001; 34(4): 311-315.

Palabras clave: Papilomavirus - Relación en cadena de la polimerasa - Neoplasia cervical intraepitelial - Cuello del útero

INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello del útero es una de las pocas enfermedades tumorales que presentan rasgos epidemiológicos característicos de las enfermedades de transmisión sexual y en el 94% de los casos está causado por el virus del papiloma humano (VPH). El papel oncogénico del VPH en las lesiones preinvasoras del epitelio escamoso cervical, así como del carcinoma invasor, se ha puesto de relieve en los últimos años a través de numerosas publicaciones (1).

En diversos estudios se ha demostrado la existencia de más de setenta subtipos de VPH (2) y alrededor de unos veinticinco subtipos distintos están implicados en lesiones de la mucosa anogenital, con distinto riesgo oncogénico (3).

La edad media de las mujeres en las que aparecen neoplasias cervicales intraepiteliales ha disminuido en los últimos años. La prevalencia ha aumentado en adolescentes y en mujeres de menos de 30 años (4). En estudios epidemiológicos publicados, se han descrito como factores de riesgo para el desarrollo de neoplasias cervicales intraepiteliales la relación sexual completa iniciada antes de los 17 años, la promiscuidad sexual, el uso prolongado de contracepción hormonal y el tabaquismo (5).

La asociación entre distintos subtipos del virus del papiloma humano (VPH) y los diferentes grados de neoplasia intraepitelial cervical y el carcinoma invasor pueden agruparse en dos categorías.

El riesgo oncogénico bajo corresponde a los subtipos de VPH 6, 11, 26, 40, 42, 53-55, 57, 59, 66, 68; el riesgo alto/intermedio, a los subtipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56 y 58, y los subtipos 16, 18 y 33 son los que más frecuentemente se han relacionado con la aparición de lesiones malignas (6).

El objetivo de nuestro estudio es conocer la prevalencia de la infección y el subtipo de VPH en pacientes con lesiones morfológicas sugestivas citológica o histológicamente.

MATERIAL Y MÉTODO

Se ha realizado un estudio observacional de tipo transversal. Durante un periodo de dos años se han estudiado las triples tomas citológicas de Wied, realizadas a 6300 mujeres de dos zonas de salud de la provincia de Ciudad

Real, que acudieron a las consultas de planificación familiar o diagnóstico precoz de cáncer de cuello uterino. Las muestras fueron enviadas desde el Centro de Salud de Tomelloso, el Servicio de Ginecología del Hospital de Manzanares, el Servicio de Ginecología del Hospital Ntra. Sra. del Carmen, el Centro de Orientación Familiar del mismo hospital y la Unidad de Citología del Centro Diagnóstico Recoletas.

En el Complejo Hospitalario de Ciudad Real se procesaron las extensiones citológicas de estas 6300 mujeres con tinción de Papanicolau modificada con el fin de realizar los diagnósticos citopatológicos y microbiológicos. Los diagnósticos citopatológicos se clasificaron según lo reflejado en la Tabla 1. Se realizaron los diagnósticos microbiológicos que constan en la Tabla 2.

En todas las lesiones intraepiteliales de alto y bajo grado, así como en los carcinomas invasores, se determinó la presencia de ADN vírico del VPH mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Para la extracción y la amplificación del ADN vírico, tanto de los frotis como de muestras incluidas en parafina, se usó el *kit PVHfast* de Pharmagen.

La amplificación se realizó sobre un fragmento de unos 450 pares de bases (pb), dentro de la región L1 del virus del papiloma humano, que presenta pequeñas variaciones en la secuencia de bases de los distintos tipos de VPH. A continuación se efectuó la electroforesis sobre un gel de agarosa al 2% y se visualizó sobre luz ultravioleta para detectar si las muestras contenían o no virus (Fig. 1). Para tipificar las muestras positivas, se tienen que incubar con las enzimas de restricción incluidas

Tabla 1. Diagnóstico citopatológico.

Negativa para malignidad
Atipia citológica de significado incierto
Lesión intraepitelial de bajo grado
Lesión intraepitelial de alto grado
Carcinoma invasor

Tabla 2. Diagnóstico microbiológico patológico.

Trichomonas
Hongos
Flora cocobacilar
Lesiones sugestivas de clamidias
Lesiones sugestivas de VPH

en el *kit*, que actúan sobre las zonas variables de la región amplificada y permiten diferenciar unos 50 tipos de papilomavirus que afectan a las mucosas, ya que cada tipo de VPH tiene un patrón característico. Las bandas del ADN se visualizan con luz ultravioleta tras correr las muestras sobre un gel de agarosa Metaphor y usando un marcador de pesos moleculares *ADN Molecular Weight Marker VIII* (Boehringer Mannheim). En todos los casos estudiados, para detectar posibles contaminaciones y verificar el funcionamiento adecuado de la reacción en cadena de la polimerasa se añadió un control negativo y otro positivo, además del control interno de cada muestra que proporciona el *KITPVHfast* (Fig. 2). La determinación de ADN viral se hizo en 60 muestras de tejido

procedente de biopsias y en 32 de frotis de cuello uterino. Las biopsias se fijaron en formol al 10% y se incluyeron en parafina.

El que a una paciente se le realizase biopsia o frotis dependió del especialista que la atendió. La extracción de ADN por la técnica de la PCR en frotis es menos difícil y hay que tener en cuenta que la parafina es un inhibidor de la Taq-polimerasa. Además, el uso de formol no tamponado o la fijación de la muestra durante más de 24 horas puede dar lugar a falsos negativos.

Se enviaban dos secciones de tejido de 5 µm incluidas en parafina y se introducían en un tubo Eppendorf de 1,5 ml para su transporte. Los frotis se tomaron con torunda seca, empleando cánulas Eurotubo. Estas mues-



Figura 1. Detección de VPH en gel de agarosa al 2% tras la amplificación. Todas las muestras, salvo la de la calle 1, que está inhibida, presentan una banda de 1200 pb que corresponden al control interno, aunque es "muy débil" en la calle 5 por la presencia de gran número de copias del virus. Las muestras positivas (calles 2 y 5) presentan otra banda de 450 pb que se sitúa más abajo. Las calles 6 y 7 son el control positiva y negativo, respectivamente, y en la última calle está el marcador de pesos moleculares (M).

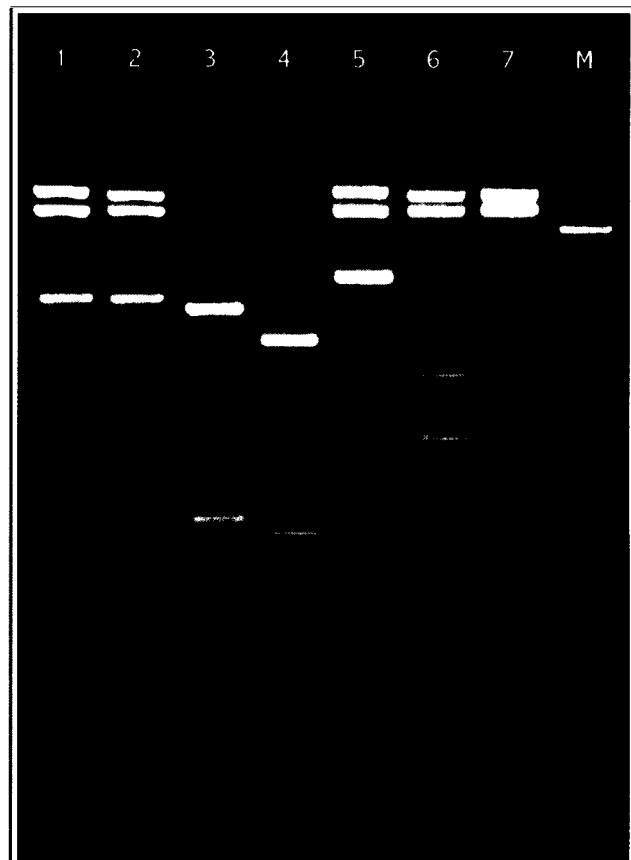


Figura 2. Lipificación de las muestras positivas para el VPH tras amplificación e incubación con las enzimas de restricción en gel de agarosa Metaphor al 2,5%. La digestión del control interno da lugar a das bandas de 650 y 550 pb (calles 1-7). En las calles 1 y 2 se identifica el tipo 16 tras la digestión con la enzima 1 y 1+2, respectivamente; en las calles 3 y 4 aparece el tipo 58 también con enzimas 1 y 1+2, y en las calles 5 y 6, el tipo 31 con la enzima 1 y 1+2. El control negativo se sitúa en la calle 7 y el marcador de pesos moleculares está en la última calle (M).

tras se conservaban a 4°C hasta su envío. La determinación por RCP del ADN del virus del papiloma humano se realizó en 92 ocasiones, incluyendo todas las lesiones intraepiteliales (74 casos) y 18 mujeres con infección por *Trichomonas* o sugestiva de clamidias.

RESULTADOS

Los diagnósticos citolopatológicos de las 6300 mujeres fueron:

- Lesiones intraepiteliales de bajo grado en 35 casos.
- Lesiones intraepiteliales de alto grado en 33 casos.
- Carcinomas invasores en 6 casos.

Aunque inicialmente diagnosticamos un caso de ASCUS (*atypical squamous cells of undetermined significance*), éste fue finalmente clasificado como lesión de alto grado. El resto de las extensiones citológicas no mostraron alteraciones. Los diagnósticos microbiológicos del total de la muestra están resumidos en la Tabla 3.

En mujeres con infección por *trichomonas* o clamidias y sin lesión citológica sugestiva de infección por VPH no encontramos en ningún caso positividad para el mismo.

En la Tabla 4 se recogen los resultados de la determinación de VPH en función del tipo de muestra.

El VPH fue positivo en el 50% de los carcinomas invasores, en el 73% de las lesiones de alto grado y en

Tabla 5. Subtipos de VPH y tipos de lesión.

Subtipos VPH	Número de casos	Tipos de lesión
VPH 16	9	6 alto grado y 3 carcinomas
VPH 31	4	1 bajo grado y 3 alto grado
VPH 33	2	2 alto grado
VPH 35	1	1 alto grado
VPH 53	2	2 alto grado
VPH 58	3	3 alto grado
VPH 16+61	1	1 alto grado
VPH 31+51	2	1 bajo grado y 1 alto grado
VPH 58+53	1	1 alto grado
No tipado	9	5 bajo grado y 4 alto grado

el 20% de las lesiones de bajo grado. La asociación entre los subtipos de virus del papiloma humano en las 34 mujeres con VPH positivo y las lesiones intraepiteliales halladas se resumen en la Tabla 5.

DISCUSIÓN

En nuestra muestra hubo una aceptable correlación entre los resultados citopatológicos y la positividad para VPH.

Los subtipos de VPH más frecuentemente encontrados en nuestras pacientes han sido el 16, el 31 y el 58. En nuestra muestra no hemos encontrado ningún subtipo 18. Más del 25% de los casos positivos a VPH lo fueron por subtipos no habituales. Estos resultados coinciden con los descritos en España por otros grupos (7, 8). Otras series de distintos países también confirman la mayor prevalencia del subtipo 16, seguido de lejos por el 18 y el 31 (9).

Las lesiones de alto grado se asociaron sobre todo a los subtipos 16 y no tipado. Los VPH no tipados se asocian a lesiones intraepiteliales tanto de bajo como de alto grado. Se ha especulado con la posibilidad de que correspondiesen, en porcentaje similar, a subtipos de VPH de bajo y alto riesgo oncogénico (10). El carcinoma invasor se asoció con el subtipo 16 en el 50% de las pacientes. Con estos resultados se podría proponer que se efectúe determinación de VPH en todas las lesiones citológicas de alto grado y bajo grado, y obtener así datos suficientes para unificar los criterios de actuación.

La explicación al hecho de que en cuatro casos se determinara más de un subtipo de VPH hay que buscarla en la posibilidad de infecciones repetidas por la exis-

Tabla 3. Resultados de microbiología patológica de las 6300 mujeres

Trichomonas	2,4%
Hongos	8,5%
Flora vocobacilar	4%
Lesiones sugestivas de clamidias	0,2%
Lesiones sugestivas de X'PH	09%
Total	16%

Tabla 4. Resultados de la determinación de VPH en función del tipo de muestra.

VPH + (n=34)		VPH - (n=58)	
Frotis	Biopsia	Frotis	Biopsia
(n=14) >41,2%	(n=20) 58,8%	(n=18) 31%	(n=40) 69%

tencia de múltiples compañeros sexuales (11). Estas infecciones pueden afectar a zonas adyacentes que posteriormente van confluyendo, lo que explica que en una misma lesión aparecieran dos tipos virales distintos.

Hacen falta más estudios que permitan relacionar las lesiones citológicas de bajo grado con VPH de alto riesgo oncogénico. La progresión hacia malignidad de estas lesiones podría darse a largo plazo o tal vez la presencia de VPH no indica necesariamente que vaya a existir una transformación maligna (12). Posiblemente otros factores, como el tiempo de evolución de la infección, las alteraciones de la inmunidad, las alteraciones hormonales, etc., podrían estar asociados al desarrollo de malignidad y son objeto de estudio en la actualidad.

Proponemos que la determinación rutinaria de VPH forme parte del protocolo habitual de actuación en Atención Primaria en mujeres con lesiones de alto y bajo grado. Desde hace dos años estamos realizando habitualmente esta determinación en el Área de Puertollano.

Mientras que los subtipos VPH con bajo riesgo oncogénico se podrían controlar rutinariamente, la detección de subtipos de VPH con alto riesgo oncogénico necesita un estrecho seguimiento citopatológico y clínico con el objetivo de prevenir la aparición de lesiones de alto grado histológico.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO - International Agency for Research on cancer. *Human Papillomavirus*. IARC, Lyon 1995.
2. Zur Hausen H, De Villiers EM. *Human Papillomavirus*. Annu Rev Microbiol 1994; 48: 427-447.
3. BaIdó A, Cazorla E, Aznar I y cois, *Estudio de la asociación de neoplasia intraepitelial cervical y la infección por virus papiloma humano*. Acta Ginecol 1997; 54: 339-342.
4. Sadeghi SR, Hgsieh EW, Guni SW. *Prevalence of cervical intraepithelial neoplasia in sexuality active teenagers and young adults. Results of data analysis of mass Papanicolau screening of 796337 women in United States in 1981*. Am J Obstet Gynecol 1984; 148: 726-729.
5. Kurman RJ, Norris HJ, Wilkinson B. *Tumors of the cervix, vagina and vulva*. AFIFL9, Washington DC 1990; 44-45.
6. Londersborough P, Ho L, Teny O, Cuzick J. *Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities*. Int J Cancer 1996; 69: 364-368.
7. Canadas MP, Martínez F, De San José S y cois, *Detection of human papillomavirus DNA by PCR in high-risk women. Validation of a protocol*. Enferm Infece Microbiol Clin 1998; 16(a): 400-403.
8. Castaño P, Pelayo A, Millana C y cois. *Detección del HPV en lesiones epiteliales del aparato genital femenino mediante PCR. Lesiones asociadas al tipo 16*. Conferencia III Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica, Marzo 2000.
9. Tonon SA, Picconi MA, Zinovich JB, Liotta DJ. *Human papillomavirus cervical infection and associated risk factors in a region of Argentina with high incidence of cervical carcinomas*. Infect Dis Obstet Gynecol 1999; 7: 237-343.
10. Grce M y cois, *Evaluation of genital human papillomavirus infections by polymerase chain reaction among Croatian women*. Anticancer Res 2001; 21(1B): 579-584.
11. Roldán M, Gómez F, Abad M. *Utilidad de las técnicas de hibridación "in situ" en citología cervicovaginal para el estudio de infecciones múltiples del virus del papiloma humano*. Patología 1994; 27: 89-91.
12. Koss LG. *Human papillomavirus - Passenger, driver or both*. Human Pathol 1998; 29: 309-310.