

# Detección del virus del papiloma humano en pacientes sin coilocitosis pero con cambios nucleares en citologías cervicales

*Human papillomaviruses detection in patients with lack of koilocytosis but presenting nuclear changes in cervical paps*

Capdeville-García D,<sup>1</sup> Martínez-Garza SG,<sup>2</sup> Gutiérrez-Constante S,<sup>2</sup> Coronado-Pérez H,<sup>3</sup> Piña-Aguilar RE,<sup>2</sup> Gutiérrez-Gutiérrez AM.<sup>2</sup>

## ► RESUMEN

**Objetivo:** Detectar la presencia del virus del papiloma humano (VPH) en pacientes con citología normal sin coilocitosis pero con cambios nucleares y correlacionarla con los datos colposcópicos.

**Material y métodos:** Se utilizó PCR e hibridación reversa en línea para reconocer la presencia de 27 tipos de VPH. Se analizaron 50 muestras consecutivas con citología normal, pero con cambios nucleares: células de tipo superficial o intermedio con citoplasma y cromatina normal; el núcleo tiene tamaño normal o un incremento discreto en el diámetro y presenta el contorno angulado o espiculado; no hay coilocitosis. La colposcopia y citología se realizaron el mismo día.

**Resultados:** Ocho de las 50 (16%) muestras presentaron VPH. Los VPH encontrados fueron seis de tipo de alto riesgo, uno de probable alto riesgo y uno de bajo riesgo. En 24/50 (48%) de las colposcopias efectuadas se encontraron zonas acetorreactivas indicativas de VPH.

**Conclusiones:** Los cambios nucleares encontrados en estas citologías normales se relacionan en 16% con la

## ► ABSTRACT

**Objective:** To detect HPV DNA in patients with lack of koilocytosis but presenting nuclear changes in cervical paps and to correlate them with colposcopic features.

**Material and methods:** HPV Consensus PCR and Line blot genotyping were used to demonstrate the presence of 27 type of HPV. Fifty consecutive cytobrushes were analyzed after the pap smear was diagnosed as normal smear but presenting nuclear changes: superficial and intermediate cells with normal cytoplasm, normal chromatin, normal o enlarged nuclei and irregularities in nuclear contour (angulations starlike) without koilocytosis). Colposcopy examination and pap smear were realized the same day.

**Results:** HPV DNA was presented in 8 of 50 samples (16%). Six high risk HPV, 1 probably high risk and 1 low risk HPV were found. Forty eight percent (24/50) of the patients presented acetowhite lesions suggesting the presence of HPV.

**Conclusion:** The nuclear changes found in these normal smears showed a 16% of association to HPV DNA, which it discards a direct relationship. However, 75% with HPV infection diagnosed by molecular test had acetowhite lesions suggesting the

1Departamento de Oncología, Hospital Aranda de la Parra. León, Guanajuato, México.

2Instituto de Ciencias en Reproducción Humana Vida-León, Plaza las Américas 115, Col Jardines del Moral. León, Guanajuato. México.

3Departamento de Patología, Hospital Aranda de la Parra, León, Guanajuato, México.

Correspondencia: Dra. Sandra G. Martínez-Garza. Plaza las Américas 115; Colonia Jardines del Moral, León, Guanajuato. México. Teléfono: (477) 717-3809, Fax: (477) 779-0836.

Correo electrónico: samartin30@yahoo.com

presencia de VPH, lo cual descarta una relación directa. Sin embargo, de las muestras que presentaron VPH, 75% mostró datos consistentes con VPH por colposcopia. Es de gran importancia realizar la detección de VPH en pacientes con una colposcopia positiva.

**Palabras clave:** colposcopia, diagnóstico molecular, PCR, México.

*presence of HPV. This information allows us to suggest that all positive colposcopies should have an HPV test.*

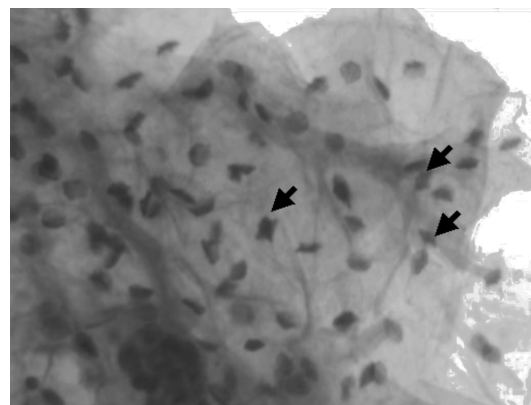
**Key words:** colposcopy, molecular diagnosis, PCR, Mexico.

## ► INTRODUCCIÓN

En la República Mexicana, el cáncer cervicouterino (CaCu) es un importante problema de salud.<sup>1</sup> Sin embargo, a pesar de las grandes campañas realizadas con el fin de llevar a cabo una detección oportuna del CaCu,<sup>2</sup> éste se reconoce aún en etapas avanzadas y por consiguiente se incrementa el número de muertes por dicha causa. A lo largo de tres décadas se ha evidenciado el papel etiológico del virus del papiloma humano (VPH) en el CaCu.<sup>2</sup> En este país, la detección del CaCu y las lesiones premalignas se realiza con el diagnóstico citológico y el informe histopatológico de biopsias del cérvix. El diagnóstico citológico de la infección por VPH en el cérvix se fundamenta en el reconocimiento de la célula conocida como coilocito. No obstante, este criterio citológico no siempre está presente y existen lesiones detectadas por colposcopia y biopsia en las que el patrón corresponde al de una lesión viral y, pese a ello, en el estudio citológico no se demuestran los datos citopáticos de la lesión por VPH. En vista de lo anterior, como estudio preliminar se revisaron 50 biopsias de cérvix en las cuales se encontraron los criterios de la lesión de VPH en el epitelio ectocervical, siempre y cuando el estudio citológico se hubiera interpretado como normal o sin cambios de lesión viral. En dichas biopsias, además de los cambios característicos a VPH, se identificaron células con cambios nucleares: células de tipo superficial o intermedio que no tienen alteraciones en el citoplasma; el núcleo muestra un tamaño normal o apenas crecido en el diámetro y posee un contorno angulado o espiculado. La cromatina corresponde a grumos finos y homogéneos; no se observan coilocitosis (**Imagen 1**). Estos cambios también estaban presentes en las citologías de estas pacientes. Tal alteración citológica puede relacionarse con el VPH y corresponder a una imagen inicial o anterior a la aparición del coilocito.

### Imagen 1.

Citología. Tinción de Papanicolaou (100x). Las células con cambios nucleares están señaladas con flechas.



Con base en estos datos preliminares y la observación de que tales cambios nucleares están relacionados con los cambios citológicos limítrofes vinculados con VPH,<sup>3</sup> se decidió analizar a un grupo de pacientes con citologías normales y estos cambios nucleares. Los propósitos del estudio fueron los siguientes: a) conocer el porcentaje de VPH en estas lesiones; b) determinar una posible relación entre VPH y dichos cambios nucleares; y, c) correlacionar la presencia de VPH con los hallazgos evidenciados por colposcopia. Los resultados de este estudio tratan de analizar si los cambios nucleares pueden anteceder a la aparición de los coilocitos producidos por la infección de VPH.

## ► MATERIAL Y MÉTODOS

### Sujetos

Previo firma del consentimiento informado, autorizado por el comité de ética, se incluyó a 50 mujeres con

diagnóstico citológico normal pero con cambios nucleares (un mínimo de 15 células con estos cambios nucleares presentes en la citología). Al momento de obtener la segunda citología, se recolectó el cepillo utilizado para realizar la preparación de la laminilla y se depositó en PBS (amortiguador de fosfatos). Con posterioridad se llevó a cabo la colposcopia. Las células cervicales se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta obtener el resultado de la citología. Además, se recogió un historial clínico para identificar los principales factores de riesgo relacionados con la infección de HPV: nombre, edad, toma de la muestra, apta para citología, antecedente familiar de cáncer, quiénes y dónde, número de parejas sexuales, uso de preservativo, menarca, edad de primera relación sexual, fecha de la última menstruación, embarazos, partos, cesáreas, abortos, anticonceptivos orales, anticonceptivos hormonales, antecedentes de infecciones vaginales, reporte de citología, informe de detección de VPH, informe de colposcopia.

### Citologías

Las muestras se fijaron y procesaron con la técnica convencional de Papanicolaou. Los frotis se analizaron en un microscopio Zeiss convencional de luz transmitida a un aumento de 100x. Todas las citologías las revisó el mismo patólogo.

### Detección de VPH

#### 1. Extracción del ADN

El tubo que contenía el cepillo se agitó mediante un vórtex para desprender las células cervicales; luego se centrifugó para recuperar el botón celular. Éste se digirió para liberar el ADN en buffer "TE-9" con adición de proteinasa K y se incubó en agitación; a continuación se realizaron dos extracciones fenol-cloroformo, de las cuales se recuperó el sobrenadante para después precipitar el ADN con sales y etanol; luego, al secarse la pastilla, se reconstituyó el ADN en TE 1X. Su cuantificación se realizó mediante densitometría con el fotodocumentador Gel Doc 2000.

#### 2. Detección del ADN del VPH

La detección y tipificación de VPH se llevó a cabo con el dispositivo HPV Consensus PCR and Genotyping donado por Roche Molecular Systems, Inc. En este instrumento se amplifica el DNA del tejido cervical mediante la PCR con la utilización de los iniciadores My09/My11 que se aparean a la región L1 del genoma del VPH (capaces de amplificar una gran variedad de tipos de VPH). En todas las reacciones se incluyó un par de iniciadores para el gen de la globina  $\beta$ , el cual sirvió como control interno para demostrar la presencia del

**Tabla 1.**

Características de la población estudiada

	Rango	Media	DE
Edad (años)	20-48	33	7
Embarazos	0-6	1.84	1.52
Partos	0-4	1	1.27
IVSA (años)	14-32	22.7	3.49
CS	1-4	1	1

IVSA, inicio de vida sexual activa; CS, compañeros sexuales; DE, desviación estándar.

DNA genómico amplificable. En seguida, el producto amplificado, marcado previamente durante la amplificación con biotina, se transfirió a las tirillas de nitrocelulosa mediante la técnica de hibridación reversa en línea y se mostró la hibridación mediante una reacción de quimio-luminiscencia. Las membranas poseen oligonucleótidos específicos para la tipificación de 27 tipos de VPH. Las tirillas de nitrocelulosa contienen unidas las sondas específicas para cada tipo de VPH en diferentes posiciones a lo largo de ella, de tal manera que posteriormente es posible determinar el tipo de VPH de acuerdo con la posición donde se apareó o "pegó" el producto amplificado a partir del ADN de las células cervicales.

### Colposcopia

Las tomas de las citologías, así como las colposcopias, las efectuó la misma ginecóloga. Se realizaron de manera convencional de acuerdo con la técnica de Schiller con ácido acético al 5% en un colposcopio Vasconcelos con una lente 40x y aumentos de 10, 16 y 25x.

### Métodos estadísticos

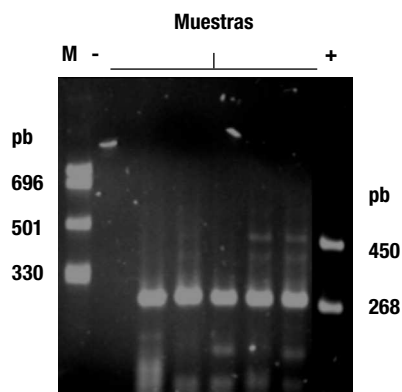
De las variables analizadas se obtuvieron porcentajes, medias y desviación estándar. Para el análisis de las medias se utilizó la t de Student y para las variables dicotómicas la prueba de Fisher.

### ► RESULTADOS

El total de las muestras incluidas en el estudio se analizó por citología y biología molecular sin dificultad alguna. La edad de las pacientes y los antecedentes ginecoobstétricos de cada una de las personas se describen en la **Tabla 1**. Las respuestas de las pacientes acerca de los métodos de anticoncepción usados fueron las siguientes: 76% utilizaba preservativo, 6% anticonceptivos orales, 8% sufría una obstrucción tubaria bilateral y 10% no usaba ningún método.

## Imagen 2.

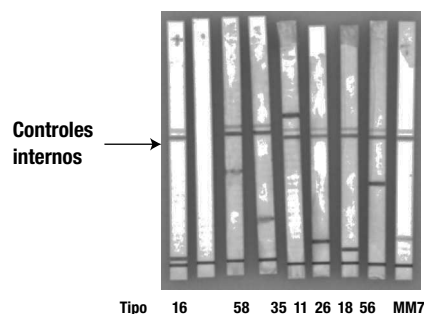
Amplificación de VPH. Gel de agarosa al 2% en el cual se observan algunos de los productos amplificados a partir del ADN; la banda de 268 pb corresponde a una porción del gen de la globina  $\beta$  (control interno) y la banda de 450 pb a la amplificación del HPV. M, marcador de peso molecular; -: control negativo; +: control positivo (muestra con VPH 16).



De las 50 pacientes estudiadas, 24 (48%) presentaron áreas acetorreactivas durante la colposcopia, un signo indicativo de la presencia de HPV. El VPH se detectó por PCR en ocho (16%) de las 50 muestras analizadas (**Imágenes 2 y 3**). De las ocho muestras que presentaron VPH, seis fueron de alto riesgo (tipos 58, 35, 18, 56 [ $n = 2$ ] y MM7), una de probable riesgo alto (tipo 26) y sólo una muestra presentó HPV tipo 11 de bajo riesgo. No se presentaron coinfecciones en ninguna de las muestras. En la **Tabla 2** aparecen un resumen de las muestras en las cuales se detectó VPH y el resultado de la colposcopia. Se agrupó a las personas en pacientes con VPH y sin

## Imagen 3.

Tipificación de VPH. Tiras para tipificar los 27 tipos de VPH; se puede observar que las sondas del control interno son positivas en todas las muestras, con excepción del control negativo; -: control negativo; +: control positivo (muestra con VPH 16); las últimas ocho tiras corresponden a pacientes.



VPH para reconocer la relación entre las características sexuales; no se reconocieron diferencias de relevancia estadística en ninguno de los grupos (**Tabla 3**).

## DISCUSIÓN

A pesar de los esfuerzos de los programas de detección temprana del CaCU, estas campañas no han sido eficaces en México por diversas razones y la enfermedad es aún un importante problema de salud pública, toda vez que es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas. Por ello se propuso realizar este estudio, con la finalidad de buscar las características indicativas de

**Tabla 2.**

Características de las muestras con VPH

No. muestra	Tipo del VPH	Característica del VPH	Resultado de colposcopia
8A	58	Alto riesgo	Positiva
9A	35	Alto riesgo	Negativa
13A	11	Bajo riesgo	Positiva
26A	26	Probable alto riesgo	Positiva
31A	18	Alto riesgo	Positiva
35A	56	Alto riesgo	Positiva
43A	MM7	Alto riesgo	Negativa
45A	56	Alto riesgo	Positiva

**Tabla 3.**

Características de las pacientes con y sin infección de HPV

Características	Infección de HPV $n = 8$	Sin infección de HPV $n = 42$
Edad	$29.8 \pm 6.7$	$33.2 \pm 7.2$
Embarazos	$1 \pm 2$	$2 \pm 2$
Partos	$1 \pm 1$	$1 \pm 1$
IVSA (años)	$21.8 \pm 4.6$	$22.9 \pm 3.3$
CS	$1.8 \pm 1.3$	$1 \pm 0$
Colposcopia positiva	6 (75%)	18 (43%)
Uso de condón	2 (33.3%)	10 (23.8%)

IVSA, inicio de vida sexual activa; CS, compañeros sexuales.

infección por VPH en citologías diagnosticadas como normales y, de esta forma, sugerir el diagnóstico molecular del VPH cuando sea necesario.

El diagnóstico de cambios nucleares en citologías de apariencia normal se vincula en 16% con la presencia del VPH, mientras que por medios colposcópicos este porcentaje es mayor (48%). Es importante señalar que estas muestras se diagnosticaron como normales en el Sistema Bethesda<sup>4</sup> y, según los estudios realizados en la población mexicana, el porcentaje de VPH en mujeres controles oscila entre 17% y 21%;<sup>5-7</sup> en el plano internacional se ha encontrado una cifra de 10.4%,<sup>8</sup> por lo que el porcentaje de 16% encontrado en este estudio se halla dentro del rango general. Es posible concluir que los cambios nucleares no parecen tener un vínculo con la infección por VPH, ya que la frecuencia de VPH es similar a la informada en citologías normales. Sin embargo, es todavía una interrogante saber si el virus no inflige un daño citológico antes de su eliminación.

Un hallazgo importante es que de las muestras que presentaron VPH, 75% (6/8) mostró datos indicativos de VPH por colposcopia. Sin embargo, no son claros los mecanismos subyacentes en el 43% de las muestras que fueron positivas por colposcopia, pero negativas para la detección de ADN de VPH. En consecuencia, los autores sugieren que las muestras positivas por colposcopia se sometan a la detección de VPH.

No se encontró relación entre ninguna de las características sexuales en los grupos de pacientes con VPH y sin él.

En México se ha observado que hasta 94% de los CaCU presenta VPH; los más frecuentes son los tipos 16 (48.8%), 18 (18.4%), 58 (15.4%) seguidos de varios tipos de VPH en bajo porcentaje.<sup>5</sup> En otro estudio en el que se analizaron muestras de citologías normales, los tipos de VPH más frecuentes fueron 16, 53, 31 y 18 (la frecuencia no fue mayor de 1.7%).<sup>7</sup> En este estudio, el VPH más frecuente fue el 56 (4% de toda la población) y todos los demás tuvieron una proporción de 2% (18, 58,

35, 11, 26 y MM7). A nivel mundial, las mujeres están infectadas con los tipos 16, 18 o ambos, en un porcentaje de 32%. Estas diferencias se pueden explicar por las características poblacionales y la dinámica epidemiológica de cada país.

Sin duda, la información encontrada aporta datos importantes para la epidemiología molecular de la población mexicana y corrobora resultados anteriores indicativos de que la infección está presente aun con una citología normal. Este estudio permitió demostrar que los cambios nucleares no se vinculan con la infección de VPH. Sin embargo, al estar presentes en estas citologías es posible un nexo con otro tipo de infecciones.

Los resultados del presente trabajo sugieren que en pacientes con citologías normales y datos consistentes con infección por VPH observados por colposcopia sería de utilidad la detección de VPH, de tal manera que pueda instituirse un seguimiento más estrecho en estas pacientes.

## Bibliografía

1. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. Registro Histopatológico de Neoplasias en México. México: Secretaría de Salud, 2000.
2. Muñoz N, Bosch X, San José S, Herrero R, Castellsagué X, Shah D, et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27.
3. Usman F, Hammond R. Cervical screening: management of patients referred for colposcopy with smear abnormalities less severe than dyscaryosis. *Cytopathology* 1998;9:100-106.
4. Solomon D, Nayar R. The Bethesda System for reporting cervical cytology. Definitions, criteria and explanatory notes. New York: Springer, 2004.
5. Montoya-Fuentes H, Suarez-Rincón AE, Ramírez-Muñoz MP, Arévalo-Lagunas I, Moran-Moguel MC, Gallegos-Arreola MP, et al. The detection of human papillomavirus 16, 18, 35 and 58 in cervical-uterine cancer and advanced degree of squamous intraepithelial lesions in western Mexico: clinical-molecular correlation. *Ginecol Obstet Mex* 2001;69:137-142.
6. Hernández-Hernández DM, Ornelas-Bernal L, Guido-Jiménez M, Apresa-García T, Alvarado-Cabrero I, Salcedo-Vargas M, et al. Association between high risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women. *Gynecol Oncol* 2003;90:310-317.
7. Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P, Hernández P, et al. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer* 2001;91:412-420.
8. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007;7:453-9.