

F. Alameda
M.L. Mariñoso
F. Solé
P. Fusté^a
C. Mariné^a
R. Carreras^a
S. Serrano

Departamento de Patología.

^aServicio de Obstetricia y Ginecología.

Hospital del Mar. IMAS. Universitat Autònoma de Barcelona.
Barcelona.

Correspondencia:

Dr. F. Alameda.

Departamento de Patología. Hospital del Mar.

P.º Marítim, 25-28. 08003 Barcelona.

Correo electrónico: 86780@imas.imim.es

Fecha de recepción: 3/1/02

Aceptado para su publicación: 30/5/02

Casos clínicos

Estudio citogenético de un carcinoma escamoso de cérvix uterino

Cytogenic analysis of a squamous carcinoma of the uterine cervix

F. Alameda, M.L. Mariñoso, F. Solé, P. Fusté, C. Mariné,
R. Carreras, S. Serrano. Estudio citogenético de un carcinoma
escamoso de cérvix uterino.

RESUMEN

Presentamos el caso de un carcinoma escamoso de cérvix uterino en una paciente de 50 años. En las células tumorales se halló la presencia del virus del papiloma humano (VPH) 16, sin otros virus acompañantes, y el estudio citogenético evidenció múltiples alteraciones cromosómicas especialmente en los cromosomas 5 y 8 así como múltiples alteraciones cromosómicas numéricas. Nuestro objetivo es enfatizar la importancia de practicar estudios citogenéticos en carcinomas escamosos de cérvix a la vez que efectuar una revisión de los datos existentes en la bibliografía.

PALABRAS CLAVE

Cérvix. Carcinoma escamoso. VPH. Citogenética. Alteraciones cromosómicas.

ABSTRACT

We present a case of squamous cell carcinoma of the uterine cervix in a 50-year-old woman, with human papilloma virus-16 infection of the tumoral cells. Cytogenetic analysis of the tumoral cells showed chromosomal alterations, especially on chromosomes 5 and 8, as well as multiple chromosomal alterations. We review the data reported in the literature.

KEY WORDS

Uterine cervix. Squamous cell carcinoma. Human papilloma virus. Cytogenetics. Chromosomal alterations.

INTRODUCCIÓN

Los carcinomas de cérvix uterino son uno de los grupos de tumores con mayor prevalencia en nuestra población. Está bastante claro el papel que desempeña la infección por el virus del papiloma humano (VPH) en la patogenia de estas neoplasias. Desde el punto de vista citogenético, se dispone de poca información acerca de las alteraciones cromosómicas que se detectan en estas neoplasias si bien existen múltiples estudios descriptivos, fundamentalmente en base a la integración de los VPH en el genoma humano¹⁻¹⁹. Presentamos el caso de una mujer que presentó un carcinoma escamoso de cérvix uterino, al que fue posible practicar estudio citogenético. Asimismo, efectuamos una revisión de la literatura en relación con las alteraciones citogenéticas de estos tumores y su valor en la clínica.

DESCRIPCIÓN DEL CASO

Presentamos el caso de una mujer de 50 años de edad sin antecedentes de interés, fumadora ocasional, que consultó por sangrado vaginal. Mediante biopsia fue diagnosticada de carcinoma escamoso de cérvix. Después de estudio de extensión que incluyó exploración bajo anestesia y práctica de resonancia magnética nuclear (RMN), se decidió tratamiento quirúrgico (Wertheim-Meigs). El estudio de la pieza quirúrgica evidenció un carcinoma escamoso cervical, de alto grado nuclear que infiltraba todo el grosor del cuello y mostraba imágenes de invasión linfática (fig. 1). No se identificó colonización neoplásica en los ganglios linfáticos disecados.

Material y método

Se realizó determinación de la presencia de virus y su tipificación, según la técnica de PVHfast (Pharmagen)²⁰. En esta técnica se utilizan los *primers* de consenso. La región amplificada fue una región común a un amplio grupo de VPH (región L1 *open reading frame*)²¹. Al mismo tiempo, se utilizó un control positivo interno para la amplificación.

La tipificación se realizó mediante digestión con enzimas de restricción obteniendo un patrón de bandas mediante electroforesis en gel de agarosa. En

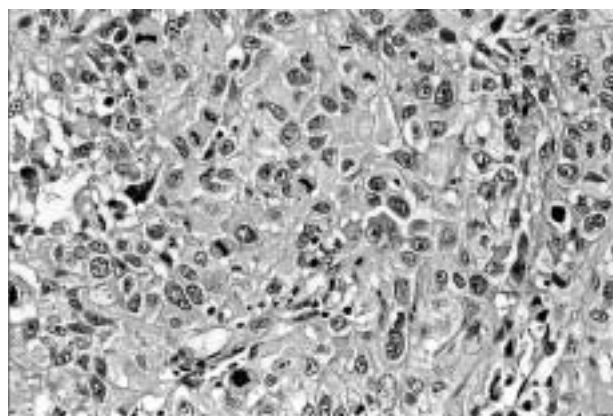


Figura 1. Carcinoma escamoso de cérvix uterino. Visión microscópica. HE

esta técnica, cada tipo de virus presenta un patrón de restricción distinto y característico previamente conocido. El patrón de restricción del VPH 16 corresponde a una banda de 309 pb.

Una muestra del tumor en fresco, que no contenía tejido no tumoral, fue utilizada para cultivo celular y estudio citogenético. La muestra fue disgregada mecánicamente y posteriormente se le añadió una solución al 0,8% de collagenasa para ayudar a separar mejor las células. Una vez que se completó la disgregación, se recogieron 2×10^6 células/ml en un Falcon con 5 ml de medio de cultivo completo (DMSO con un 20% de suero bovino fetal). El Falcon se colocó en una estufa de cultivos a 37 °C con un 5% de CO₂ durante 3 días. Al tercer día se realizó un cambio del medio de cultivo, y día a día se valoró el crecimiento celular. En el quinto día de cultivo se añadió un antimitótico, colcemid, a una concentración final de 0,1 µg/ml de medio de cultivo, y se dejó actuar durante 24 h. Seguidamente se añadió la solución hipotónica (KCl 0,075 M) durante 20 min, y posteriormente se realizaron tres cambios de fijador Carnoy (tres partes de metanol:una parte de ácido acético). Con el producto del cultivo se realizaron cuatro extensiones sobre portaobjetos que fueron teñidas con el colorante de Wright para tinción de bandas G.

Resultados

El resultado de la PCR se visualizó en un gel de agarosa en el que se demostró la presencia de VPH

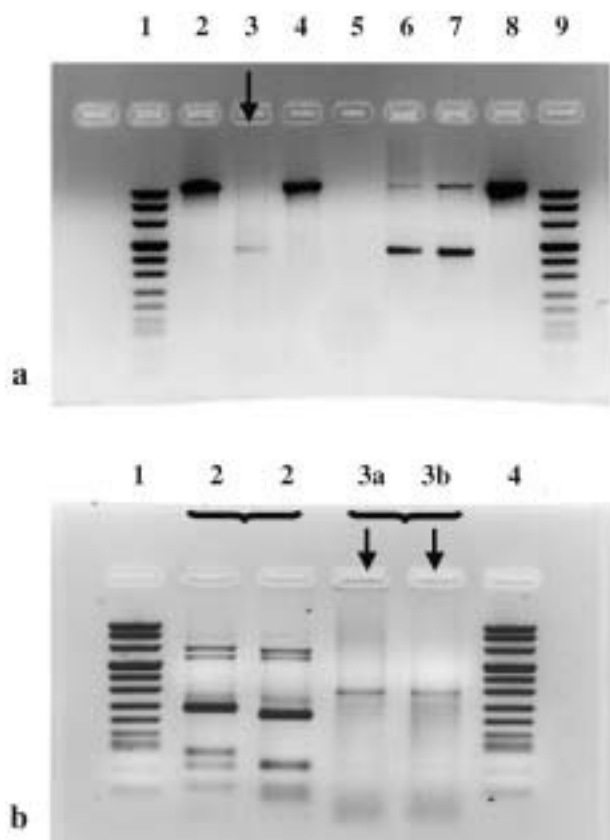


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa. a) Demostración de la presencia de VPH. Caso problema: columna 3. Se observa una banda de 450 pb que corresponde al genoma del VPH. Control positivo: columna 7. Control negativo: columna 8. En todas las columnas, excepto en la columna 3 (caso problema), se observa una banda de 1.200 pb que corresponde al control interno. Cuando hay un elevado número de copias de virus no se detecta esta banda correspondiente al control interno. b) Tipificación con enzimas de restricción que demuestra la presencia de VPH-16 (columnas 3, a y b). Método: el producto amplificado de la PCR de la muestra positiva es incubado con enzimas de restricción 1 (columna 3a) y 1 y 2 (columna 3b) y se carga en un gel de agarosa de alta resolución. Se origina un patrón de bandas que depende del tipo de virus. El VPH-16 origina bandas de 309 pares de bases.

(fig. 2). El tipado por digestión con enzimas de restricción se visualizó en un gel de agarosa de alta resolución, y se obtuvo una banda de 309 pb. La presencia de esta banda nos permitió identificar el VPH-16 (fig. 2b).

Estudio citogenético: 8 metafases 7, 8, XX, +1, +1, +2, +3, +add(3)(p11), +4,dic(5;?)(q;?),i(5)(p10),

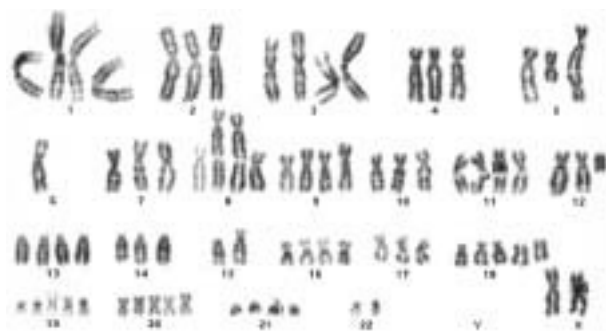


Figura 3. Cariotipo de las células tumorales. (Véase descripción en texto.)

–6,del(7)(p11p13), +add(8)(q24), +add(8)(q24), +9, +9, +10, +11, +11, +i(12)(p10), +13, +13, +14, der(15;22)(q10;q10), +16, +16, +17, +18, +18, +19, +19, +i(19)(q10), +21, +21 (fig. 2).

En el cariotipo destaca una hiperdiploidía con la ganancia de múltiples cromosomas, y como alteraciones estructurales, la presencia de un isocromosoma i(5p), i(12p), i(19q), y la ganancia del brazo largo del cromosoma 8 (fig. 3).

DISCUSIÓN

Es un hecho conocido la relación existente entre la infección por VPH, de alto riesgo, y el desarrollo de carcinoma cervical.

Los virus de alto riesgo producen las oncoproteínas E6 y E7 que reaccionan con p53 y pRB, respectivamente, alterando el ciclo celular normal y situando a la célula en actividad proliferativa constante¹⁷. Además, producen otras dos proteínas: una de ellas, la E2, tiene capacidad de frenar el ciclo en fase de síntesis; y la otra, la E5, es capaz de inducir expresión del receptor de EGF en la membrana de la célula. Cuando este receptor está activado, utilizando la vía intrínseca de las cinasas, actúa como factor de transcripción induciendo proliferación celular.

La actividad de las oncoproteínas tiende a inmortalizar las células infectadas, pero para que se produzca una neoplasia, la dotación genética de la célula debe ser alterada. Una forma de ser alterada, es integrar el ADN viral en el ADN de la propia célula. Se desconoce de qué depende la integración del ADN vírico en la célula, y es posible que dependa

Tabla 1 Alteraciones cromosómicas descritas en las displasias

Cromosoma	Alteración	Referencias bibliográficas
1	Tetraploidía	14
3	3p14-21 (FHIT)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14
	3p23-24 (Beta catenina)	
6	6p21-23 (TNF-alfa)	7, 14
8	8q24 (C-MYC)	9, 10, 11, 12, 16
11	11q13 (Ciclina D1)	13, 14
13	13q14 (pRb)	8

Tabla 2 Alteraciones cromosómicas descritas en el carcinoma de cérvix

Cromosoma	Alteración	Referencias bibliográficas
4	Isocromosoma	14
5	Isocromosoma	14
6	6p24	7, 14
11	11p15; 11q22-24	13, 14
17	17p13.3	15
18	18p11; 18q21	14
19	19p13; 19q12-13	14

de la cantidad de copias virales que contenga una célula, es decir, de la carga viral¹⁸.

Los lugares donde se integra el ADN viral también son importantes. El ADN viral se integraría en aquellas zonas del ADN celular que se llaman regiones frágiles por su facilidad en romperse. Cuando los virus se integran en el ADN celular pierden la capacidad de producir E2, pero no de producir las demás oncoproteínas.

Varios son los *loci* cromosómicos donde se ha encontrado integración de los VPH. La integración es mucho más variable y frecuente en los casos de carcinoma que en las displasias. Así, se hallan muchas más alteraciones cromosómicas en las neoplasias que en las displasias. Además, en las neoplasias se repiten muchas de las alteraciones cromosómicas halladas en los procesos displásicos. El valor de muchas de ellas, sin embargo, es desconocido.

En la tabla 1 se exponen las alteraciones que se han descrito en las displasias. Se desconoce el valor de las tetraploidías descritas en el cromosoma 1, pero algunos autores piensan que tiene importancia en el paso a carcinoma invasor¹⁴. Se ha descrito integración viral en el brazo corto del cromosoma 3, en una región de fácil rotura (FHIT), situada en 3p14-21. Algunos autores piensan que en esta región está situado un gen supresor tumoral, pero ésta no es una opinión generalizada. Se ha hallado también integración en otra región, 3p23-24, donde está situado el gen de beta catenina. Sin embargo, no parece tener mucha importancia en la génesis del cáncer de cérvix^{1-7,14}.

Se ha descrito también la integración de los VPH en el brazo corto del cromosoma 6, en la región 6p21-23 en la región donde se encuentra el gen del factor de necrosis tumoral (TNF) alfa parece llevar a

la célula a una menor susceptibilidad a la apoptosis. En este cromosoma se encuentran también los genes de los antígenos de histocompatibilidad (HLA)^{7,14}.

El C-MYC, situado en el cromosoma 8 (8q24), está amplificado en un 35-45% de las displasias leves y parece que también lo está en los carcinomas de cérvix, pero en la bibliografía existen resultados contradictorios. Se desconoce el valor de este hallazgo respecto a la progresión de la displasia leve^{9-2,16}.

Se ha encontrado alteración del brazo largo del cromosoma 11 (11q13), en la región que codifica ciclina D1, que es una de las proteínas que regula el ciclo celular. La ciclina D1 se detecta normalmente en los cérvix uterinos sin displasia y se pierde su detección inmunohistoquímica en las displasias^{13,14}.

La frecuencia de integración de VPH en el brazo largo del cromosoma 13 (13q14; pRb) aumenta con la severidad de la displasia hasta el carcinoma invasor. En un 30% de casos no se halla integración⁸.

En la tabla 2 se exponen las alteraciones halladas en los carcinomas escamosos de cérvix, además de las descritas en las displasias.

El cromosoma 3 se encuentra alterado en el 48% de los carcinomas de cérvix (el 65% de carcinomas escamosos y el 35-40% de adenocarcinomas). Algunos autores piensan que estas alteraciones pueden ser utilizadas como indicadores de progresión tumoral (se halla en un 25% de casos FIGO-I y en el 100% de casos FIGO-IV)^{1-7,14}.

Se ha descrito isocromosoma en los cromosomas 4 y 5. El isocromosoma en el 4 se halla en el 92% de los carcinomas de cérvix y es más frecuente en carcinomas escamosos (83%) que en adenocarcinomas (50%)¹⁴. El isocromosoma en el cromosoma 5 se ha descrito con integración de VPH 18. Está alterado en estadios avanzados de la enfermedad (III y

Tabla 3 Otras alteraciones cromosómicas descritas en el carcinoma de cérvix

Integración VPH en cromosomas 2, 9, 10, 12 y 15
Amplificaciones de MYC, BCL-1; Ras, ERBB2
Inestabilidad de microsatélites
Ganancia de los cromosomas 1, 3, 17

IV). Algunos autores han hallado estas alteraciones en displasias, pero no es un hecho comprobado¹⁴.

Además de las alteraciones descritas en las displasias, se ha descrito integración de VPH en el cromosoma 6, en 6p24, en un 50% de casos de carcinoma de cérvix, la mayoría en estadios FIGO-I^{7,14}.

En los carcinomas de cérvix se encuentran dos regiones del cromosoma 11 alteradas, distintas de las halladas en las displasias: 11p15 (el 28% de los casos) y 11q22-24 en estadios FIGO I y II. Algunos autores piensan que en estas regiones puede haber un gen supresor tumoral^{13,14}.

Se han descrito alteraciones en 17p 133, donde está mapado el gen de p53, pero en baja frecuencia y en aquellos casos de carcinoma de cérvix no relacionados con el VPH¹⁵.

Se han descrito diversas alteraciones en 18p11, 18q21, 19p13, 19q12-13, pero se desconoce su valor¹⁴.

En los carcinomas de cérvix se han descrito además las siguientes alteraciones (tabla 3):

1. Integraciones en los cromosomas: 2 (2p24; 2q24-35), 9 (9q31-34), 12 (12q14-15), 15 (15q14-15) y 22 (22q12-13).
2. Amplificaciones: se han descrito amplificaciones de MYC, SEA, CCND, BCL1, GLI, RAS, ERBB-2. (10-12,22). No se han hallado amplificaciones de MDM2, SRC, PDGF, entre otros.
3. Inestabilidad de microsatélites: detectada en el 8-10% de los casos de cáncer de cérvix¹⁷.
4. Ganancias de cromosomas: además de las descritas respecto al cromosoma 1, se han descrito en el cromosoma 17 y ganancias del cromosoma 3 en el paso de carcinoma *in situ* a carcinoma invasor.

Nuestro caso puede ser un ejemplo ilustrativo de las alteraciones genéticas que pueden hallarse en un carcinoma escamoso cervical, entre las que destacan la presencia de un isocromosoma 5, ganancia de 8q, y la presencia de múltiples alteraciones cromosómicas numéricas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chung GT, Huang DP, Lo KW, Chan MK, Wong FW. Genetic lesion in the carcinogenesis of cervical cancer. *Anticancer Res* 1992;12:1485-90.
2. Wilke CM, Hall BK, Hoge A, Paradee W, Smith DI, Glover TW. FRA3B extends over a broad region and contains a spontaneous HPV16 integration site: direct evidence for the coincidence of viral integration sites and fragile sites. *Hum Mol Genet* 1996;5:187-95.
3. Wong YF, Chung TK, Cheung TH, Tam PO, Chang AM. Frequent loss of heterozygosity of chromosome 3 short arm detected by PCR-based microsatellite polymorphisms in cervical squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 1997;115:161-4.
4. Witsuba II, Montellano FD, Milchgrub S, Virmani AK, Behrens C, Chen H, et al. Deletions of chromosome 3p are frequent and early events in the pathogenesis of uterine cervical carcinoma. *Cancer Res* 1997;57:3154-8.
5. Greenspan DL, Connolly DC, Wu R, Lei RY, Vogelstein JT, Kim YT, et al. Loss of FHIT expression in cervical carcinoma cell lines and primary tumors. *Cancer Res* 1997;57:4692-8.
6. Segawa T, Sasagawa T, Yamazaki H, Sakaike J, Ishikawa H, Inoue M. Fragile Histidine triad transcription abnormalities and human papillomavirus E6 E7 mRNA expression in the development of cervical carcinoma. *Cancer* 1999;85:2001-10.

7. Rader JS, Gerhard DS, O'Sullivan MJ, Li Y, Li L, Liapis H, et al. Cervical Intraepithelial neoplasia III shows frequent allelic loss in 3p and 6p. *Gen Chrom Cancer* 1998;22:57-65.
8. Mark HF, Santoro K, Campbell W, Hann E, Lathrop J. Integration of human papillomavirus sequences in cervical tumor cell lines. *Ann Clin Lab Sci* 1996;26:147-53.
9. Nagai N. Gene diagnosis of uterine cancer. *Rinsho Byori* 1994;42:372-79.
10. Petrov SV, Mazurenko NN, Sukhova NM, Moroz IP, Katsnel'son VM, Raikhlin NT, et al. Cell oncogene expression in normal, metaplastic, dysplastic epithelium and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Ark Patol* 1994;56:22-31.
11. Aoyama C, Peters J, Senadheera S, Liu P, Shimada H. Uterine cervical dysplasia and cancer: identification of c-myc status by quantitative polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 1998;7:324-30.
12. Dellas A, Schultheiss E, Leivas MR, Moch H, Torhorst J. Association of p27Kip1, Cyclin-E and C-MYC expression with progression and prognosis in HPV positive cervical neoplasms. *Anticancer Res* 1998;18:3991-8.
13. Mugica-Van Herckenrode C, Rodríguez JA, Iriarte-Campo V, Carracedo A, Barros F. Definition of a region of loss of heterozygosity at chromosome 11q in cervical carcinoma. *Diagn Mol Pathol* 1999;8:92-6.
14. Mitra AB, Murty VV, Li RG, Pratap M, Luthra UK, Chaganti RS. Allelotype analysis of cervical carcinoma. *Cancer Res* 1994;54:4481-7.
15. Busby-earle RM, Steel CM, Williams AR, Cohen B, Bird CC. P53 mutations in cervical carcinogenesis- low frequency and lack of correlation with human papillomavirus status. *Br J Cancer* 1994;69:732-7.
16. Gallego MI, Zimonjic DB, Popescu NC, DiPaolo JA, Lazo PA. Integration site of human papillomavirus type 18 DNA in chromosome band 8q22.1 of C4-I Cervical Carcinoma: Dnase I hypersensitivity and methylation of cellular flanking sequences. *Gen Chrom Cancer* 1994;9:28-32.
17. Lazo PA. The molecular genetics of cervical carcinoma. *Br J Cancer* 1999;80:2008-18.
18. Milde-Langosch K, Riethdorf S, Löning T. Association of HPV infection with carcinoma of the cervix uteri and its precursor lesions: Theoretical and practical implications. *Wircnows Arch* 2000;437:227-33.
19. Kersmaekers AM, Van der Vijver A, Kenter GG, Fleuren GJ. Genetic alterations during the progression of squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Gen Chrom Cancer* 1999;26:346-54.
20. PVHfast, PharmaGen, S.A. Madrid. Spain. Disponible en: <http://www.pharmagen.es>.
21. Resnick RM, Cornelissen MT, Wright DK, Eichinger GH, Fox HS, Ter Schegget J, et al. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:1477-84.