

11217
98
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

JUL 26 1993
S. DE INVESTIGACIONES
MEDICAS Y BIOLÓGICAS
ANEXO 1 DE LA UNAM

TIPIFICACION DEL SUBGRUPO DE PAPILOMA CERVICAL POR HIBRIDIZACION IN SITU, CORRELACION CON MICROSCOPIA ELECTRONICA

[Signature]
DR. SAMUEL KARCHMER K.
DIRECTOR GENERAL
PROFESOR TITULAR

[Signature]
DR. JESUS MERCE SEGURA
SUBDIRECTOR DE SALUD Y
EDUCACION PROFESIONAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL POSTGRADO EN:

GINECO-OBSTETRICIA

P R E S E N T A :

DR. GIANCARLO MUÑOZ DI-DOMENICO

ASESOR: DRA: HILDA VILLEGAS CASTREJON

MEXICO, D. F.

NOVIEMBRE DE 1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE.

INTRODUCCION.....	3
MARCO TEORICO.....	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
RAZONES PARA DESARROLLAR LA INVESTIGACION.....	14
OBJETIVOS.....	15
MATERIAL Y METODOS.....	16
RESULTADOS.....	19
DISCUSION.....	22
CONCLUSIONES.....	29
BIBLIOGRAFIA.....	31

INTRODUCCION

La primera descripción de verrugas se encuentra en los escritos de Celsus (25a.C). En los siguientes cinco siglos, médicos griegos y romanos escribieron acerca de las verrugas y notaron la transmisión sexual de estas lesiones verrugosas en los genitales (1).

El origen viral de este tipo de verrugas fue postulado primero por Ciuffo en 1907; sin embargo, fue sólo hasta la introducción del microscopio electrónico a la medicina en 1940, que se hizo observación directa de las partículas virales en el tejido proporcionando el apoyo a la teoría del origen viral de las verrugas. Dunn y Ogilvie documentaron partículas virales en el condiloma genital en 1968 (2).

Una heterogenicidad de tipos del virus del papilloma humano, fue postulada en 1969; sin embargo, nada se conocía acerca de la organización genómica o el modo de interacción: célula-virus. Además la ausencia de un sistema adecuado en el cual replicar el virus representaba una gran dificultad para el estudio científico sistemático. La solución se produjo al clonar virus del papilloma humano procedentes de lesiones de vías genitales, permitiendo disponer de cantidades elevadas de DNA del virus para investigación. Los primeros datos publicados de hibridización en 1974, sugirieron que más de un tipo de virus del papilloma humano (VPH), causaba condiloma acuminado. La heterogenicidad genética del papilloma fue establecida en 1976 y permitió la

identificación de cuatro diferentes tipos de VPH (1,3).

A la fecha, más de cincuenta tipos de VPH han sido identificados usando técnicas de hibridización de DNA, aclarándose su organización genómica, transcripción del RNA y la traducción de proteínas. Empero, la mayor importancia fue el advenimiento de la identificación de la relación del VPH y cáncer hacia 1983, cuando se reconoció DNA del VPH en cánceres cervicales usando mezclas de tipos 8,9,10 y 11 como pruebas. Pero, sin lugar a dudas la evidencia más fuerte que ligó al VPH con cáncer provino de pacientes con epidermodisplasia verruciforme (1,4).

Desafortunadamente, la investigación clínica es sólo hasta este momento en que vuelve su mirada a los grandes avances en biología molecular en el área de investigación del papel de VPH y su relación con cáncer.

Es por todo lo anterior, que sin lugar a dudas, los descubrimientos futuros habrán de proporcionar adelantos importantes en el campo clínico.

MARCO TEORICO

Aunque no es posible construir un modelo estructural comprensivo y coherente del ciclo entero de vida del virus existe información básica del virus del papilloma humano (VPH).

El VPH, es miembro de la familia papovavirus. Estos virus fueron agrupados juntos porque todos tienen una doble cadena circular de DNA y el genoma se encuentra rodeado por una capsida icosaédrica (20 caras). Tiene un diámetro de 55 nanómetros y una estructura icosaédrica compuesta por 72 subunidades básicas llamadas capsómeros. No hay membrana lipídica externa.

Las partículas virales contienen una proteína mayor en su capsida con un peso molecular de aproximadamente 54000 daltons. Una proteína menor de aproximadamente 76000 daltons también ha sido identificada. En general cada tipo de papillomavirus es específico para una especie, tipo de epitelio y localización anatómica; la mayoría de los virus afectan solamente las células de epitelio escamoso, llamado queratinocitos.

El ciclo de vida del VPH es poco diferente de otro tipo de virus, en la epidermis normal solamente las células de la capa basal se dividen por lo que el VPH debe ganar acceso a infectar esta capa basal de células. Los queratinocitos de las capas más superficiales normalmente no se dividen, pero progresivamente se diferencian de las células más externas del epitelio. Esta se acompaña de cambios secuenciales en el tipo de queratina que están expresando. Generalmente los papillomavirus inducen

hiperplasia de las capas celulares medias, referidas como acantosis; en las capas más superficiales hay degeneración nuclear y en algunas células degeneración con vacuolización citoplasmática, en el tracto genital las células con vacuolización citoplasmica o hiperchromasia nuclear son llamadas coilocitos. En algunas de estas capas más superficiales, síntesis de nuevo DNA viral y altos niveles de expresión de algunos genes virales, pueden ser demostrados por experimentos de hibridización in situ. Así mismo, de acuerdo a estudios con microscopía electrónica nuevas partículas virales se encuentran en algunas células en las capas más superficiales.

La caracterización del VPH, y su relación con cáncer cervical ha sido amparado por muchos años por dos dificultades básicas. Los papillomavirus no se encuentran disponibles en cantidades suficientes para realizar análisis bioquímicos y de biología molecular ya que no se pueden recuperar de cultivos celulares.

Los virus tienen que ser purificados directamente de especímenes clínicos con producción viral usualmente limitada. Sin embargo, hay una gran variedad de VPH que en ocasiones difieren considerablemente uno de otro en la secuencia de nucleótidos de sus genomas. Por consiguiente, la clonación molecular de las cadenas de DNA de los diferentes tipos de VPH son un requisito para identificar tumores genitales con la presencia de estos virus que normalmente pueden ser aislados de lesiones displásicas o neoplasias cervicales.

Las características clínicas, el aspecto histológico y la evolución natural de las enfermedades genitales asociadas con papillomavirus dependen en gran parte del tipo de DNA que se descubre dentro de las lesiones. Así por ejemplo, algunos autores refieren análisis gráficos dependiendo del subgrupo; definiendo el espectro en cuatro categorías (5-8):

1. "Bajo riesgo": VPH 6/11, 42, 43 y 44. Detectadas en lesiones de bajo riesgo sin nexo con neoplasias.
2. "Riesgo Intermedio": VPH 31, 33, 35, 51, 52 y 58. Observadas en un alto porcentaje de lesiones intraepiteliales escamosas, pero sólo en un 10.5% promedio de los cánceres.
3. "Alto riesgo/VPH16": presente en un 47.1% tanto de lesiones de alto riesgo del epitelio escamoso como en cánceres.
4. "Alto riesgo/VPH18": encontrado en el 26.8% de carcinomas invasivos pero tan sólo en un 6.5% de lesiones intraepiteliales de alto riesgo.

Esto significa que la presencia de un tipo de VPH oncogénico en una lesión cervical, el porcentaje de riesgo relativo es de 65.1-235.7 para la presencia de lesiones epiteliales de alto riesgo y de 31.1-296.1 para un cáncer invasivo (8,9).

Las repercusiones en el varón de la infección condilomatosa es la existencia de lesiones principalmente a nivel del surco balanoprepucial, frenillo y uretra. Así mismo, es conocida la repercusión perinatal que tiene la condilomatosis y que llega en momentos determinados a ser factor decisivo para elegir la vía de interrupción de la gestación.

Lo anterior se relaciona, con el hecho de que en los Estados Unidos de Norteamérica, la mayoría de las infecciones por VPH permanecen indetectadas; ya que aproximadamente el 1% a 2% de mujeres bajo vigilancia citológica de rutina para detección de neoplasia cervical tienen evidencia de infección cervical por VPH. Empero, actualmente se sabe que la infección por VPH es probablemente la infección más común, ya que de estudios citológicos usando técnicas de biología molecular sugirieron que por arriba del 28% de mujeres sexualmente activas han albergado infección genital por VPH; y se estima que solamente un 10% aproximadamente de todas las infecciones genitales por VPH acuden para atención clínica. Así, puede haber más de 30 millones de mujeres con infección del VPH genital en los Estados Unidos solamente y muy posiblemente 10 millones de mujeres portadoras del virus potencialmente oncogénicos (10).

El perfil epidemiológico que hace a una mujer ser de alto riesgo para el condiloma, es significativamente similar a la observada para la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y el carcinoma del cuello uterino, lo que incluye el inicio temprano de relaciones sexuales, parto antes de los 19 años, promiscuidad sexual, estrato sociocultural bajo y tabaquismo.

La transmisión de la o de las parejas sexuales de condilomatosis subclínica y clínica es de aproximadamente 60% a 65% (11,12); tomando en cuenta que la reinfección es una causa importante para recurrencias.

En lo referente a tratamiento, existen dos indicaciones principales la primera es aliviar la irritación, la incomodidad o el dolor. Los pacientes con condilomatosis acuminada caen dentro de esta categoría y segundo, la prevención de la neoplasia dada la conocida asociación de VPH con neoplasia escamosa del tracto genital inferior, este tratamiento puede resumirse en:

1. Químico, entre los que podemos incluir podofilina al 25%, ácido tricloro-acético, 5-fluoracilo, Bleomycina, Colchicina, etc.

2. Quirúrgicos; 3. Inmunológico como Levanisole, DNCB, etc;

4. Químico-quirúrgico; 5. Sicoterapia y 6. Radioterapia. Los métodos destructivos tienen una recurrencia del 7% al 33% (electrocauterización), la criocirugía se reporta con un éxito del 80% al 90% y otros métodos destructivos se reportan con un promedio de curación de 95% a 97% (asa diatérmica, fotocoagulación con laser CO₂), siendo actualmente preferida la primera sobre la segunda dada la ventaja de poder ser estudiada histológicamente. Actualmente se tiene la esperanza en los métodos inmunológicos, utilizando una vacuna autogena y la utilización del interferon reporta una curación del 75%.

De lo anterior podemos concluir que aproximadamente el 90% de las infecciones genitales por VPH son de tipo "benigno" ya que contiene subtipos de VPH que no se incorporan al DNA de las células epiteliales; la manifestación clínica es el condiloma verrucoso (acuminado, exofítico) raro en el cérvix, perteneciendo principalmente a los subtipos VPH 6, 11 y 10.

El restante 10% de los condilomas genitales tienen un alto potencial "maligno"; la lesión generalmente no es visible macroscopicamente ya que corresponde a las variedades aplanada e invertida muy frecuentes en el cérvix, y en éstas se han demostrado VPH subtipos 16, 18, 31 y 35 (13-15).

No hay manera de identificar clínicamente si la infección corresponde a VPH de "bajo" o "alto" riesgo.

En general, entre el 5% y el 10% de todos los condilomas cervicales muestran una progresión hacia la neoplasia, siendo mayor en los casos atípicos (16).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El VPH ha sido implicado en la génesis de varios tipos de cáncer humano, particularmente tumores escamosos del cérvix, región anogenital, piel, tracto respiratorio superior y aparato digestivo la técnica de hibridación in situ, es el único método para demostrar la localización precisa del genoma viral del VPH en cortes de tejido así como en células individuales. Sin embargo, hoy la microscopía de frotis citológico o cortes histológicos es todavía el método más frecuente y conveniente de diagnóstico de la infección por VPH.

Comparando la precisión diagnóstica de los estudios citológicos e histológicos con las técnicas de detección de biología molecular, se ha aprendido que el diagnóstico microscópico de infección por VPH es bastante específico, aunque no muy sensible.

Los cambios celulares cervicales que indican infección por VPH, son reconocibles en una citología por la presencia de coilocitos y disqueratosis. La prevalencia de VPH en estudios citológicos rutinarios varía entre 0.41% hasta el 10.9%; así mismo es esperado un mayor porcentaje en población de riesgo. La colposcopia ha sido comparada con el estudio histológico, siendo la sensibilidad del primer estudio del 75.6% en tanto que la sensibilidad del segundo estudio fue de 79.7% en conjunto fue del 94.9% (17).

La conjunción de ambas técnicas anteriormente mencionadas son el

medio más conveniente para el diagnóstico de una infección por VPH. Son procedimientos de consultorio, que pueden repetirse si es necesario; tomando en cuenta la multifocalidad de las lesiones por VPH, el frotis es superior a la biopsia porque permite el estudio de grandes áreas del mismo sitio en una sola muestra. Empero, aunque una tipificación del subtipo de VPH puede ser realizada por esta técnica, ya que como se sabe existe una diferencia notoria en el potencial oncogénico y la conducta pronóstica de las lesiones producidas por los tipos 6 y 11 del VPH a los tipos 16 y 18 del VPH, no es el material ideal para estudio dada su discutida sensibilidad y especificidad por los diferentes autores.

Sin lugar a dudas esto ha llevado a que en la actualidad nuestro problema en cuanto a la condilomatosis se puede enfocar básicamente en:

1. Conocer la relación directa existente entre VPH y neoplasia intraepitelial cervical.
2. Conocer la repercusión perinatal que tienen las enfermedades de transmisión sexual como lo es la infección por virus del papilloma humano.
3. La necesidad de implementar métodos diagnósticos que sean efectivos y que puedan estar al alcance de la mayoría de la población, para con esto lograr un tratamiento oportuno.

4. La capacidad de identificar población de alto riesgo para un manejo y seguimiento adecuado.

Lo anterior se basa en el hecho de que reportes actuales clínicos de infecciones por VPH, como parte de las enfermedades de transmisión sexual, han sido realizados desde hace varios años atras y estos datos indican un continuo incremento en la incidencia de VPH tanto en hombres como en mujeres. El porcentaje de ambos grupos de incidencia para 1982 revelo un total de 71.25% por 100.000 personas; esto es 52.90% en mujeres y 90.5% en hombres (17,18). Esto corresponde a un incremento tres veces en ambos sexos en los últimos cien años.

RAZONES PARA DESARROLLAR LA INVESTIGACION

Conocer la frecuencia con que se aislan subtipos del VPH 16, 18, 31 y 33 de alto riesgo en lesiones condilomatosas de cérvix en las pacientes que acuden a la clínica de Enfermedades de Transmisión Sexual del Instituto Nacional de Perinatología.

Así como identificar otros subtipos de bajo riesgo incluyendo lesiones genitales que puedan ser confundidas con condilomatosis sin serlo. Estos eventos comprometen a la paciente ya que la obligan a someterse a tratamiento y vigilancia estrecha que tal vez no requiera; lo cual representa preocupación y gasto económico para la misma, por otra parte permite la identificación de pacientes de alto riesgo como desencadenantes de lesiones pre-malignas lo cual motiva un seguimiento exhaustivo por parte del personal médico y paramédico para un adecuado seguimiento y tratamiento.

Por lo que es necesario implementar procedimientos seguros altamente confiables que interactuen con los métodos diagnósticos sencillos y fáciles de aplicar para tener un adecuado seguimiento de la población que pueda identificarse como de muy alto riesgo.

OBJETIVOS

1. Por medio de las técnicas de DNA recombinante fomentar la realización de estudios que sirvan para definir específicamente el papel de los distintos tipos de VPH en el cáncer genital.
2. Tratar de identificar el subtipo de VPH de más frecuencia en la población del Instituto Nacional de Perinatología.
3. Mejorar la prevención y el tratamiento de las infecciones por VPH mediante la identificación de la población de riesgo y la capacitación profesional.

MATERIAL Y METODOS

Diecinueve mujeres fueron incluidas prospectivamente de la clínica de enfermedades de transmisión sexual del Instituto Nacional de Perinatología, entre noviembre de 1991 y agosto de 1992.

Las pacientes fueron referidas a la clínica de displasias, para una evaluación colposcópica, por presentar: (1) papanicolaou anormal, (2) lesión cervical visible ó (3) una historia pasada o presente de enfermedad cervical con o sin tratamiento previo.

Las pacientes ingresadas en el estudio iniciaban su manejo en la clínica de displasias cuando el espécimen de biopsia cervical fue obtenido.

Se realizó un papanicolaou de rutina en todas las pacientes estudiadas, mediante brocha y cepillo durante su visita al examen colposcópico. Estas pacientes ya tenían citología cervical previa tomada con hisopo.

El examen colposcópico fue realizado en todas las pacientes por el mismo investigador experto en el área; y las zonas aparentemente anormales fueron biopsiadas y enviadas para examen histopatológico de rutina. Siendo tomadas un total de 31 biopsias dirigidas. A cada muestra le fue asignada un número de código. Todos los especímenes de biopsia fueron fijados en formol neutro en amortiguador de fosfatos Sorensen 0.1M, pH7.4, durante 24hrs; posteriormente incluidos en parafina, teñidos con eosina-hematoxilina y evaluados por dos patólogos quienes estaban

ignorantes de los resultados de los estudios para DNA de VPH. El grado de displasia fue realizado de acuerdo a los criterios de la organización mundial de la salud para NIC I leve, NIC II moderada y NIC III displasia severa o carcinoma in situ (19).

La coilocitosis fue definida como la presencia de un discreto halo perinuclear asociado con un amplio núcleo arrugado o plegado (17,20). Las citologías cervicales fueron teñidas con tinción Papanicolaou y reportadas como negativas, atípicas, sospechosa (displasia) o positiva de acuerdo a los criterios citológicos establecidos (21).

Los bloques de biopsia incluidos en parafina, fueron posteriormente rescatados para su procesamiento en la técnica de hibridación in situ. Los bloques fueron inicialmente montados en laminillas selanisadas en cortes de 4 μ m de espesor, se desparafinaron sometiéndose después a digestión sumergiendo los cortes en solución de pepsina/HCl durante 10 minutos a 37 grados. La desnaturalización e hibridación fue realizado con sondas biotiniladas individuales de DNA de VPH 6, 11, 16, 18, 31 y 33 usando un kit de hibridación in situ ViraType (DAKO, USA), el proceso se llevó a cabo en una cámara húmeda a 37 grados durante dos horas, posteriormente se procedió a la detección utilizando para ello BCIP/NBT así como estreptavidina-AP; momento en que se realiza el revelado de las copias blanco.

Los tejidos fueron contrateñidos utilizando rojo rápido procediéndose posteriormente al montaje. Cada uno de los casos se corrió con un control positivo y negativo respectivamente

utilizándose para el primero genoma humano (GH) y para el segundo un plásmido pBr 322.

Las laminillas procesadas para hibridización in situ, fueron posteriormente observadas por tres diferentes investigadores, usando para ello un microscopio fotónico axioskop Carl Zeiss.

Finalmente las laminillas identificadas como positivas para DNA de VPH fueron procesadas para técnica de Microscopía Electrónica. El tejido desparafinado se postfijo en tetraóxido de osmio (OsO₄) al 1% en amortiguador de fosfatos Sorensen 0.1M, pH 7.4 por 1 1/2 horas. Posteriormente se procedió a la deshidratación de los tejidos, utilizando etanol en concentraciones ascendentes. La infiltración se hizo en una solución de 1:1 de óxido de propileno Poly Bed 812 y se dejó polimerizando a 60°C por 24 horas.

De los cortes semifinos de 1 µm de espesor, teñidos con azul de toluidina fueron seleccionadas las áreas para corte fino previamente contrastadas con uranilo y citrato de plomo para ser observadas en un microscopio electrónico Carl Zeiss EM-10C.

A todas las pacientes incluidas en el estudio, se les realizó una historia clínica con énfasis en sus hábitos higiénicos así como de su pareja y sus costumbres sexuales.

RESULTADOS

Diecinueve pacientes de la clínica de enfermedades de transmisión sexual del Instituto Nacional de Perinatología, fueron estudiadas las cuales presentaban lesiones condilomatosas en cérvix identificadas por medio de colposcopia y previa citología exfoliativa positiva para condilomatosis.

La edad promedio de las pacientes fue de 29.05 años con un rango entre los 20 y 56 años. El inicio de vida sexual activa fue de 23 años con un rango entre los 15 y los 28 años.

En lo que concierne al estado civil de las pacientes, el 89.47% (17/19) eran casadas, 5.26% divorciadas (1/19) y un 5.26% (1/19) vivían en unión libre.

De la población estudiada, el 100% presentaban lesión cervical, tomándose bajo guía colposcópica la biopsia dirigida para estudio anatómo-patológico; se determinaron como lesiones únicas el 63.15% (12/19) y como lesiones múltiples el 36.84% (7/19).

De las 19 pacientes estudiadas fueron positivas el 36.33% de las citologías exfoliativas y el 63.15% se reportó como reacción inflamatoria inespecífica. El estudio histopatológico de las biopsias cervicales dirigidas por colposcopia tomadas a estas pacientes reportó un 89.4% (17/19) positivos para condiloma. En tanto que un 10.6% (2/19) se reportaron como negativas para condiloma, pero positivas para neoplasia intraepitelial grado II y III respectivamente.

Dentro de los hallazgos encontrados en las biopsias de cérvix el 78.9% (15/19) fueron de condilomatosis aislada, el 5.2% (1/19) de

los casos de condilomatosis asociada a NIC I, otro 5.2% (1/19) de los casos de condilomatosis asociada a NIC II, el 10.5% (2/19) de los casos se reportó como displasia cervical grave (cáncer in situ NIC III) sin condilomatosis.

Podemos observar que el 10.5% de los casos co-existieron asociados: condilomatosis y neoplasia cervical.

La colposcopia como estudio aislado reportó como casos positivos un 84.21% (16/19), teniendo un margen de error en nuestro estudio de 10.6%.

La técnica de hibridización in situ, se realizó en el 100% (19/19) de los casos seleccionados, resultando en tres casos positivos para VPH. Dentro de estos dos casos positivos para DNA de VPH fácilmente observables en el interior del núcleo de las células del material estudiado (foto 2 y 3) y el tercer caso positivo lo fue también para DNA de VPH. Ninguno de los casos positivos contenía más de un tipo viral dentro del material estudiado. Los tipos de VPH 6 y 11 no fueron detectados en ninguno de los casos.

De los tres casos positivos, uno co-existía con displasia moderada (NICII). En ambos casos el mismo tipo de VPH 18 fueron detectados (incluyendo el caso de condilomatosis más NIC II); el tercer caso fue positivo para DNA de VPH 16 (tabla 1).

Las zonas positivas para DNA de VPH fueron seleccionadas, cortadas y procedas para microscopia electrónica con el fin de corroborar la presencia de viriones de papillomavirus (copias), como parte de su ciclo de reproducción. Puede apreciarse en la

micrografías electrónicas la presencia de partículas esféricas virales de 40 n.m. de diámetro no sólo presentes en el material detectado positivamente por técnica de hibridización sino también en zonas periféricas (fotos 4 y 5).

TIPO DE PACIENTE

NO EMBARAZADA 19
100%

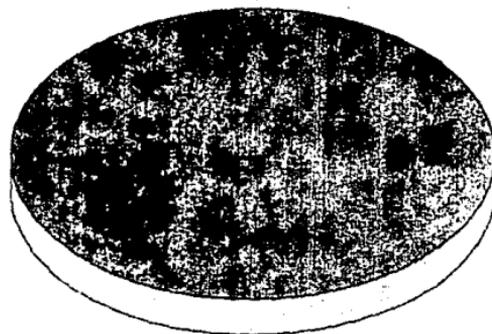


Fig. 1

VDRL

NEGATIVO 19
100%

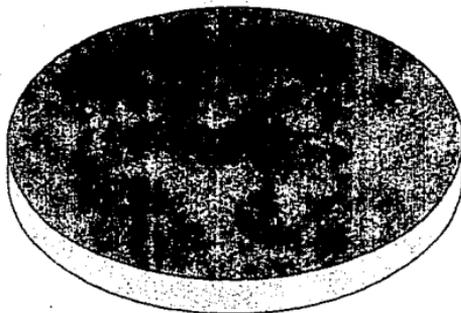


Fig. 2

PARIDAD

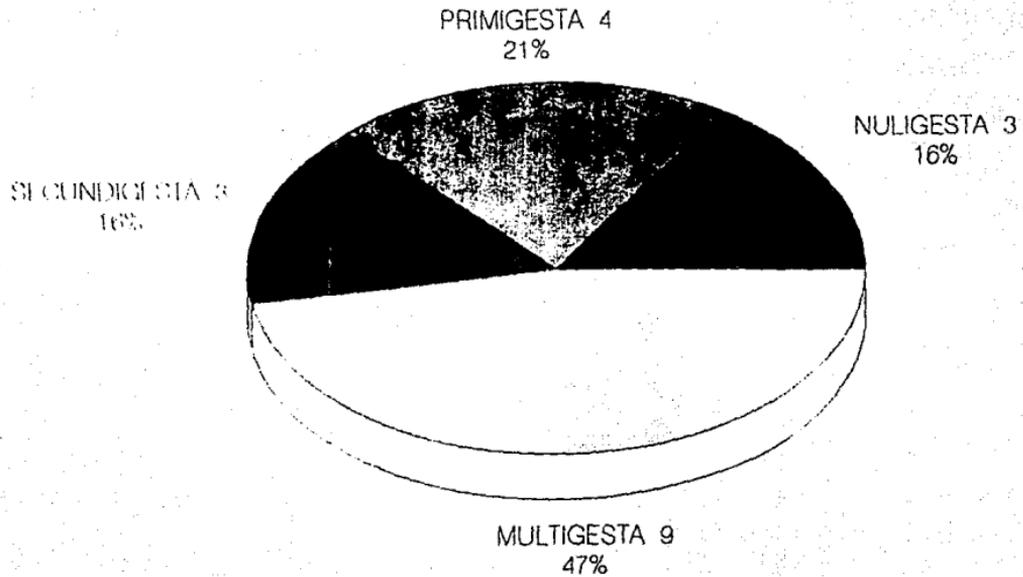


Fig. 3

ESTADO CIVIL

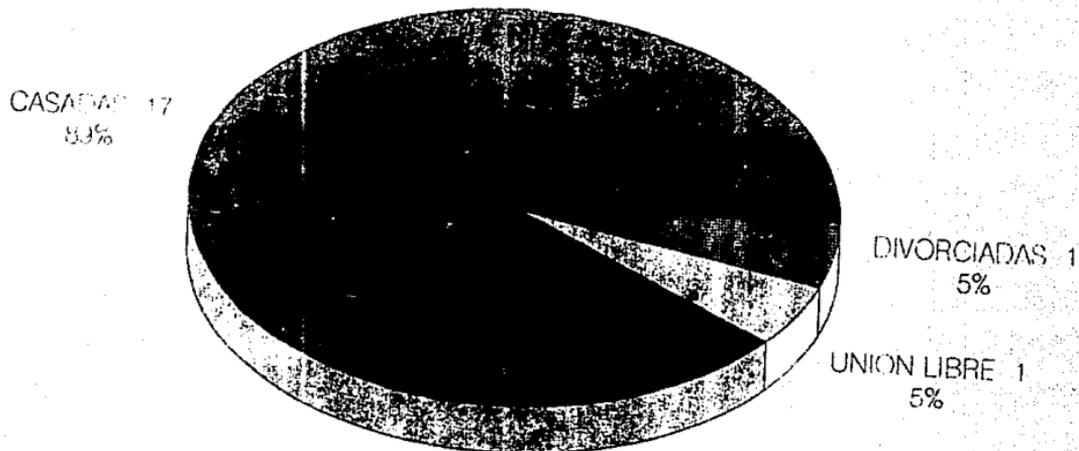


Fig. 4

COLPOSCOPIA

No. DE LESIONES

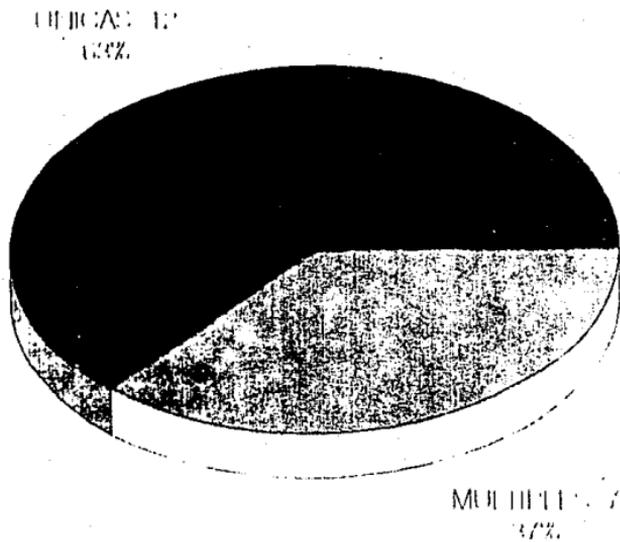


Fig. 5

CITOLOGIA

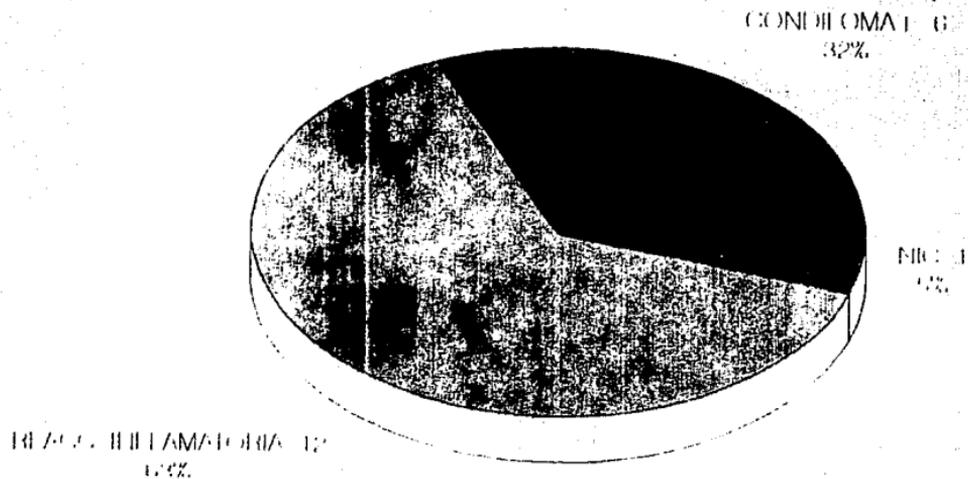
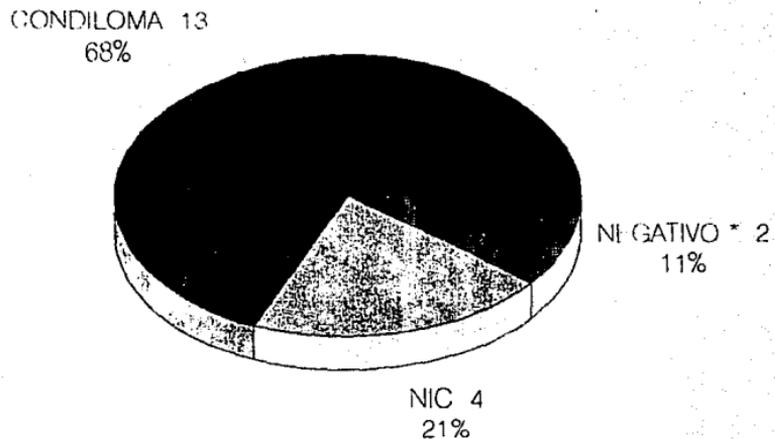


Fig. 6

BIOPSIA CERVICAL



FOTOS TOMAS DE MUESTRA

Fig. 7

HALLAZGOS DE BIOPSIA CERVICAL

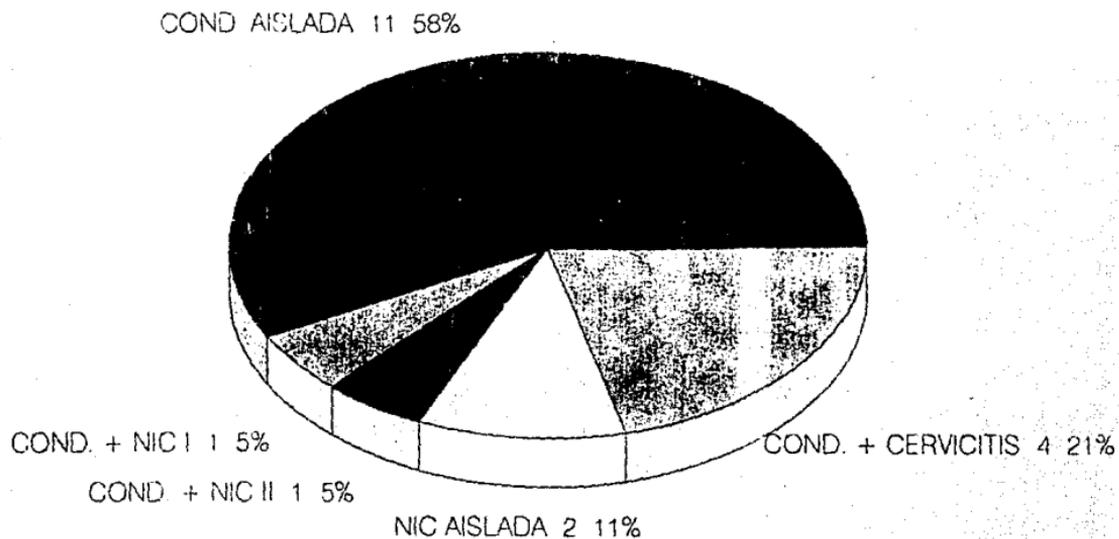


Fig. 8.

TABLA I. HALLAZGOS CERVICALES EN 19 PACIENTES.

No.	CITOLOGIA	COLPOSCOPIA	PAATOLOGIA	HIBRIDACION	TIPO
H-3486-91	POSITIVO	NIC I	NIC II	NEGATIVA	-
H-3448-91	NEGATIVA	CONDILOMA	CONDILOMA	NEGATIVA	-
H-3449-91	NEGATIVA	CONDILOMA	NEG./COND. *	NEGATIVA	-
H-44-92	NEGATIVA	CONDILOMA	CONDILOMA	NEGATIVA	-
H-162-92	NEGATIVA	NEGATIVA	CONDILOMA	NEGATIVA	-
H-348-92	NEGATIVA	CONDILOMA	CONDILOMA	NEGATIVA	-
H-714-92	NEGATIVA	CONDILOMA	CONDILOMA	NEGATIVA	-
H-752-92	NEGATIVA	NEGATIVA	CONDILOMA	NEGATIVA	-
H-1098-92	POSITIVA	CONDILOMA	COND. + NIC I	NEGATIVA	-
H-1099-92	NEGATIVA	CONDILOMA	CONDILOMA	POSITIVA	UPH 16
H-1876-92	NEGATIVA	CONDILOMA	CONDILOMA	POSITIVA	UPH 18
H-1877-92	POSITIVA	CONDILOMA	CONDILOMA	NEGATIVA	-
H-2028-92	NIC II	NIC II	NIC III **	NEGATIVA	-
H-2046-92	NEGATIVA	CONDILOMA	CONDILOMA	NEGATIVA	-
H-18006-92	NEGATIVA	CONDILOMA	CONDILOMA	NEGATIVA	-
H-1498-92	POSIT./NIC I	CONDILOMA	COND. + NIC II	POSITIVA	UPH 18
H-1963-92	NEGATIVA	CONDILOMA	CONDILOMA	NEGATIVA	-
H-2118-92	POSITIVA	CONDILOMA	CONDILOMA	NEGATIVA	-
H-2119-92	POSITIVA	CONDILOMA	CONDILOMA	NEGATIVA	-

* RESULTADO DE DOS BIOPSIAS.

** DX. CONDILOMA POR PIEZA HISTOLOGICA.



Figura 1. Panorámica de un control positivo (GH), de Hibridización In-Situ. Epitelio endocervical con reacción positiva para hibridación in situ. 100X.

Figura 2. Hibridación In-Situ para VPH 18. Notese la tinción nuclear positiva a nivel epitelial (flecha). 200X.

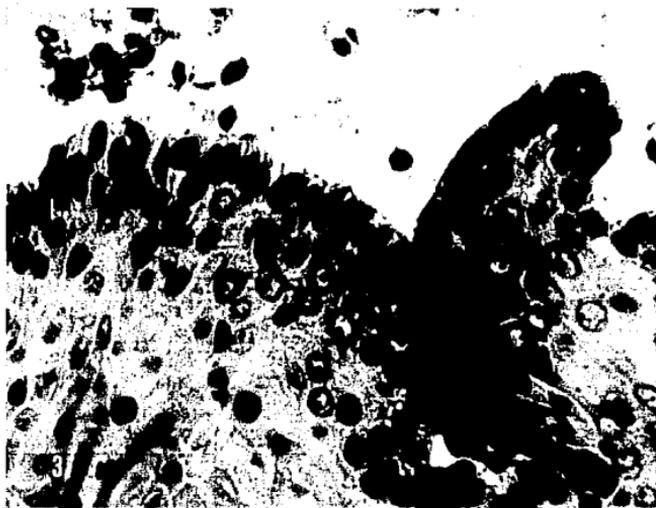


Figura 3. Hibridación In-Situ para VPH 16. En la que se puede apreciar tinción nuclear puntiforme y mixta a nivel nuclear 400X.

Figura 4. Micrografía Electrónica en la que se advierte la presencia de partículas esféricas virales (viriones) de 40nm de diámetro en el material procesado por técnica de hibridización In-Situ.



Figura 5. Micrografía Electrónica en la que se demuestra VPH (flecha) en el interior celular del material de cervix estudiado.

DISCUSION

Un gran número de estudios han demostrado una asociación específica entre ciertos tipos de virus del papilloma humano y lesiones pre-malignas y malignas del cérvix (1-8,22,23). Para evaluar la asociación entre el tipo de DNA de VPH y el grado de lesión en nuestras pacientes, el tipo de DNA de VPH fue correlacionado con el diagnóstico de la biopsia cervical en diecinueve pacientes.

El tipo 18 del VPH fue el más frecuentemente encontrado en nuestra población estudiada y estaba presente en dos espécimenes de biopsia de diecinueve pacientes estudiadas (10.5%), siendo seguida por la presencia del tipo 16 del VPH en un 5.2% (1/19), ambos tipos identificados como de alto riesgo para la lesión pre-maligna y maligna de cérvix.

Es importante mencionar, que existen pocos estudios publicados en México y en general en América Latina en donde se analice el subtipo de VPH comparándolo con material de biopsia obtenido de cérvix. En un estudio publicado por Reeves y colaboradores (24), decidieron evaluar la posible asociación entre infección por virus del papilloma humano y cáncer cervical en un estudio multicéntrico (caso-control) realizado en diferentes países de América Latina; su población estudiada fue de 759 casos de los cuales el 62% de sus pacientes fue positivo para DNA de VPH 16/18 detectada por hibridización in situ siendo la detección en sus controles significativamente menor; concluyendo que su detección

era demasiado amplia con respecto a otros reportes probablemente como consecuencia de que no tuvieron controles adecuados y segundo tal vez a un incremento en la prevalencia de VPH en la población latina. El tipo de material estudiado difiere con respecto al de nuestro estudio.

En la literatura extranjera, se aprecia una amplia variación en la prevalencia de DNA del VPH en lesiones cervicales, dependiendo de las diferentes localizaciones geográficas así Ritter y Kadish (22), detectaron virus del papilloma humano en 114 de 191 (59.7%) mujeres estudiadas en los Estados Unidos de Norteamérica debiendo aclararse que la técnica utilizada para este estudio fue southern blot; Spitzer y colaboradores (25) detectaron VPH (DNA y RNA) por técnica de hibridización in situ en el 18.19% (6/33) de las pacientes estudiadas, siendo solamente positivos cinco casos para DNA de VPH en este estudio.

La mayoría de los investigadores concuerdan en que la prevalencia del DNA del VPH, parece que varía ampliamente dependiendo de las técnicas de detección utilizadas, el número de tipos de VPH que son estudiados, el tipo de población así como el origen geográfico de la muestra dada. Lo anteriormente señalado es importante ya que en un número significativo de estudios publicados, esta prevalencia varía desde un 0.5% hasta un 35%, aunque las comparaciones directas entre los diferentes tipos de estudio son difíciles debido a las diferentes técnicas de hibridizado que son usadas. De hecho, el porcentaje de detección y sensibilidad, por tanto, de nuestra técnica de hibridización se

encuentra dentro del rango de las reportadas en otras investigaciones.

Algunos investigadores como Nieminen (26), hablan de la existencia de una prevalencia dada para cada grupo de población en estudio, esto es un porcentaje realmente bajo para pacientes en población abierta en tanto que ésta se incrementa significativamente cuando son referidas directamente a estudios de hibridización provenientes de clínicas de colposcopia o con citologías francamente sospechosas.

En la mayoría de los trabajos de investigación el porcentaje de detección de DNA de VPH en material de carcinomas cervicales estudiados varía entre un 40% a un 90%; lo cual difiere del tipo de población incluida en nuestro estudio, encontrándose los resultados de nuestra detección por técnica de hibridización in situ para este tipo de muestra dentro de los límites de prevalencia aceptados por los investigadores (23-36).

La técnica utilizada para nuestro estudio fue la de hibridización in situ por medio de un kit comercial con sondas separadas, la cual se basa en exponer directamente el tejido estudiado con sondas de cadenas de DNA de los genomas de los diferentes tipos de VPH e hibridizar bajo condiciones estrictas de astringencia. Lo que hace notar la alta especificidad de este tipo de estudios. Es importante mencionar que sin duda la hibridización in situ del tejido, es útil en la identificación del VPH en tejidos fijados y en la localización del genoma viral en tipos celulares específicos. Otra de las razones para la utilización de esta

técnica es que las otras técnicas de investigación como son la hibridización Southern Blot y la Polimerase Chain Reaction (PCR), no pueden ser aplicadas rutinariamente en la práctica clínica no sólo por su alto costo sino porque estas técnicas destruyen el tejido y en el caso de la PCR, puede ser demasiado vulnerable a la contaminación.

Las técnicas clínicamente disponibles como son la citología, la colposcopia y la histología son también inherentemente imperfectas, ya que las características histológicas clásicas no siempre están presentes.

La citología tiene un alto porcentaje de falsas negativas, en nuestro estudio fue de 63.15% y la colposcopia no es lo suficientemente específica. En nuestro estudio, la definición de positivo por técnica colposcópica fue muy amplia y algunas de las lesiones pueden haber representado metaplasia inmadura o algunas otras no relacionadas con infección por VPH ya que en algunos casos más de un sitio fue tomado para biopsia (7/12).

Esto puede explicar porque la colposcopia fue capaz de detectar el 84.21% (16/19) de las lesiones por histología como positivas, pero no fue capaz de predecir el resultado de hibridización comparado con otros estudios. Algunos autores (27,28), concuerdan que los estudios colposcópicos muestran cambios histológicos clásicos de lesiones condilomatosas en aproximadamente sólo el 20% de los casos, por lo que los signos colposcópicos de infección por VPH son esencialmente aquellos sumariados bajo el bien establecido término de "zona anormal de transformación", lo

que explica los resultados obtenidos en nuestro estudio. Sin embargo, no observamos ninguna correlación entre los hallazgos por estudio colposcópico y los diferentes tipos de VPH en nuestro trabajo.

Esta ausencia de hallazgos moleculares positivos en la técnica de hibridización in situ en pacientes que tuvieron evidencia de enfermedad tanto citológica, colposcópica así como de biopsia puede indicar una verdadera ausencia de enfermedad, infección con un tipo diferente de VPH de aquellos que fueron probados o infección con niveles subdetectables del virus. Se sabe que en una lesión displásica la diferenciación celular y la replicación viral están inhibidas y que por tanto los estudios de hibridización puedan resultar negativos (29). Siendo por tanto, muy probable que algunos de nuestros casos se encontraran en esta situación.

Clínicamente la multiparidad ha sido un factor relacionado con el cáncer cervical, siendo en algunos estudios hasta del 75% (30). En nuestro trabajo encontramos que el 47.36% de las pacientes fueron multíparas, lo que podría resaltar el hecho de que en caso de infección por VPH existe incremento en su frecuencia a la par con la paridad.

Llama la atención que encontramos dentro de los antecedentes de nuestras pacientes que el 89.47% practicaban una vida sexual estable y monogámica por lo que es de pensar que la transmisión de la infección haya ocurrido a través de su pareja. Se sabe que aproximadamente el 65% de los compañeros sexuales de mujeres con

infección por condiloma tienen signos clínicos de infección por VPH en sus genitales (11,12), otros autores hablan de hasta un 82% (31). Muchos de los hombres afectados no presentan síntomas y no reconocen sus lesiones por lo que les permite ser fuente de re-infección a su compañera sexual.

Es importante mencionar que el potencial oncogénico o la prevalencia de los diferentes tipos de VPH pueden variar en diferentes grupos raciales o áreas geográficas (22,24,25); por lo que otros estudios prospectivos deben realizarse en México aclarando este aspecto.

La habilidad para detectar estos tipos de VPH con un alto potencial oncogénico para una población dada, puede proporcionar a la clínica una utilidad adjunta a los métodos estandares conjuntos de citología y colposcopia para un adecuado monitoreo a la mujer con riesgo para enfermedad cervical. Debiéndose recordar que lo importante de esta asociación es que la presencia de infección por VPH hace que la edad en que se presente la neoplasia intraepitelial cervical sea menor y que su progresión se acelere.

En este trabajo la mayoría de las pacientes con lesiones pre-malignas y malignas del cervix tenían un promedio de 29.05 años de edad. Estos hallazgos son característicos de la edad de incidencia de lesiones de alto riesgo en cervix de mujeres expuestas a infección por VPH.

Definitivamente la detección de pacientes con este tipo de infección en nuestros hospitales, así como su seguimiento será de

valiosa utilidad. La alta prevalencia del VPH en mujeres jóvenes, sexualmente activas y su asociación frecuente con displasia es inquietante. Las pacientes necesitan exámenes de seguimiento y citologías repetidas, así como biopsias de toda lesión sospechosa las cuales en conjunto son ciertamente altamente sensitivas pero no específicas.

Estos procedimientos más el tratamiento local con métodos quirúrgicos menores, probablemente constituirán en el futuro un paso importante para la profilaxis del cáncer cervicouterino.

CONCLUSIONES

Sin lugar a dudas la condilomatosis es un padecimiento cada vez más frecuente y que afecta principalmente a la mujer joven en edad reproductiva y socialmente activa.

Recientemente se ha logrado corroborar la estrecha asociación existente entre la infección viral por papillomavirus y el desarrollo de neoplasia cervical, actuando probablemente como un co-factor que favorece la oncogénesis.

Actualmente con el desarrollo en biología molecular existen nuevos métodos para identificar con exactitud a la población dentro de grupos de alto o bajo riesgo, lo que nos permite trazar un adecuado plan de manejo y seguimiento en estas pacientes.

Si bien podemos constatar que la citología cervical, la colposcopia y la biopsia cervical en conjunto proporcionan alta sensibilidad e incrementan considerablemente su especificidad no son las técnicas ideales ante los nuevos métodos de diagnóstico; así mismo, estas técnicas tradicionales de escrutinio pierden confiabilidad al realizarse por separado.

Es por todo lo anterior, que dada la importancia del cáncer cervical como problema de salud mundial, que se pueden realizar las siguientes consideraciones:

1. Se debe fomentar la realización de estudios que sirvan para definir específicamente el papel de los distintos tipos de VPH en el cáncer cervical, en el área epidemiológica, clínica y experimental.

2. Establecer procedimientos de diagnóstico rutinario para permitir al clínico la detección rápida, sensible y confiable de infecciones por los distintos tipos específicos de VPH.

3. Mejorar la prevención y el tratamiento de las infecciones por VPH mediante la educación para la salud y la capacitación profesional.

Pero sin lugar a dudas, los clínicos deben llevar a cabo un seguimiento cercano de estas lesiones tomando en cuenta que ninguna de estas técnicas debe ser usada en forma aislada para dar un manejo.

BIBLIOGRAFIA

1. Krebs BH. Milestones in HPV Research. Clin Obstet Gynecol 1989; 32:107-111.
2. Dunn AEG, Ogilvie MM. Intranuclear Virus Particles in Human Genital Wart Tissue: Observations on the ultrastructure of the epidermal layer. J Ultrasound Res 1968; 22:285-241.
3. Gissmann L, Pfister H, zur Hausen H. Human papilloma viruses (HPV): Characterization of four different isoletes. Virology 1977; 76:569-578.
4. Gissmann L. Linking HPV to Cancer. Clin Obstet Gynecol 1989; 32:141-147.
5. Stoler MK, Rhodes ChR, Whitbeck A, Wolinsky SM, Chow LT, Broker TR. Human Papilloma Type 16 and 18 Gene Expression in Cervical Neoplasias. Hum Pathol 1992; 23:117-128.
6. Hildesheim A, Mann V, Brinton LA, Szklo M, Reeves WC, Rawls WE. Herpes Simplex Virus Type 2: A Possible Interaction with Human Papillomavirus Types 16/18 in the Development of Invasive Cervical Cancer. Int J Cancer 1991; 49:335-340.
7. Rusk D, Sutton GP, Look KY, Roman A. Obstet Gynecol 1991; 77:918-922.
8. Lorincz AT, Reid R, Jenson B, Greenberg DM, Lancaster W, Kurman RJ. Obstet Gynecol 1992; 79:328-337.
9. Stone KM. Epidemiologic Aspects of Genital HPV Infection. Clin Obstet Gynecol 1989; 32:112-116.
10. Krebs HB. Management Strategies. Clin Obstet Gynecol 1989; 32:200- 213.

11. Krebs HB, Helmkamp BF. Treatment failure of genital condylomata acuminata in women: Role of the male sexual partner. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:337-340.
12. Krebs HB, Helmkamp BF. Does the Treatment of Genital Condylomata in Men Decrease the Treatment Failure Rate of Cervical Dysplasia in the Female Sexual Partner ?. *Obstet Gynecol* 1990; 76:660-663.
13. Schneider A, Meinhardt G, Kirchmayr R, Schneider V. Prevalence of Human Papillomavirus Genomes in Tissues from the Lower Genital Tract as Detected by Molecular In Situ Hybridization. *Int J Gynecol Pathol* 1991; 10:1-14.
14. Leary J, Jaworski R, Houghton R. In-situ Hybridization using Biotinylated DNA Probes to Human Papillomavirus in Adenocarcinoma-in situ and Endocervical Glandular Dysplasia of the Uterine Cervix. *Pathol* 1991; 23:85-89.
15. Arends MJ, Wyllie AH, Bird CC, Path FR. Papillomaviruses and Human Cancer. *Hum Pathol* 1990; 21: 686-698.
16. Jacquemier J, Clavel C, Birembaut P. Faut-il typer les papillomavirus dans les lésions génito-anales. *Ann Pathol* 1991; 2:77-79.
17. Kjaer SK, Lyng E. Incidence, prevalence and time trends of genital HPV infection determined by clinical examination and cytology. In: *Human Papillomavirus and Cervical Cancer*. Eds. Muñoz N, Bosch FX, Jensen OM. WHO-IARC Scientific publications No.94. Lyon, France 1989.

18. Syrjanen KJ. Epidemiology of Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with genital squamous cell cancer. *APMIS* 1989; 97:957-970.
19. Anonimo. Histologic typing of female genital tract tumors. Geneva: World Health Organization, 1975:55-57.
20. Koss LG. Diagnostic cytology and its histopathological bases. Vol 1. 3rd.ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1979:328-375.
21. Singer A. The abnormal cervical smear. *Br Med J* 1986; 293:1551-1556.
22. Ritter DB, Kadish AS, Vermund SH, Romney SL, Villari D, Burk RD. Detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in exfoliated cervicovaginal cells as a predictor of cervical neoplasia in a high-risk population. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159:1517-1525.
23. Lawrence WD. Advances in the Pathology of the Uterine Cervix. *Hum Pathol* 1991; 22:792-806.
24. Reeves CW, Brinton AL, García M, Brenes MM, Herreo R, Gaytán E, Tenorio F, Rawis EW. Human papillomavirus infection and cervical cancer in Latin America. *N Engl J Med* 1989; 320:437-441.
25. Spitzer M, Brandsma JL, Steinberg B, Chernys AE, Krumholz AB. Detection of Conditions Related to Human Papillomavirus. *J Rep Med* 1990; 35:697-703.
26. Nieminen P, Soares VR, Aho M, Vesterinen P, Savia E, Vaheri A Paavonen J. Cervical human papillomavirus deoxyribonucleic acid and cytologic outpatients. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164:1265-1269.

27. Reid R, Campion MJ. HPV-Associated Lesions of the Cervix: Biology and Colposcopic Features. Clin Obstet Gynecol 1989; 32:157-179.
28. Scheider A, Sterzik K, Buck G, Villiers E-M. Colposcopy is Superior to Cytology for the Detection of Early Genital Human Papillomavirus Infection. Obstet Gynecol 1988; 71:236-241.
29. Tsutsumi Y, Kawai K, Hori S, Osamura Y. Ultrastructural Visualization of Human Papillomavirus DNA in Verrucous and Precancerous Squamous Lesions. Acta Pathol Jpn 1991; 41:757-762.
30. Kulski JK, Demeter T, Mutavdzic S, Sterrett FG, Mitchell MK, Pixley CE. Survey of Histologic Specimens of Human Cancer for Human Papillomavirus Types 6/11/16/18 by Filter In Situ Hybridization. Am J Clin Pathol 1990; 94:566-570.
31. Krebs HB. Genital HPV Infections in Men. Clin Obstet Gynecol 1989; 32:180-190.