



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Facultad de Medicina



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
"SALVADOR ZUBIRÁN"

Tesis

CORRELACION CITOISTOLÓGICA DE LESIONES  
INTRAEPITELIALES DE LA REGIÓN DEL ANO Y TIPIFICACIÓN DE  
VPH EN HOMBRES QUE TIENEN SEXO CON HOMBRES.

Que presenta:  
Víctor Hugo Méndez Cano

Para obtener el título de:  
ESPECIALISTA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA

Tutores de Tesis

Dra. Diana Elodia Aguilar León  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"  
Departamento de Anatomía Patológica

Dr. Daniel Montante Montes de Oca  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"  
Departamento de Anatomía Patológica

Ciudad de México,  
México  
2017



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 esta 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.

## **CONTENIDO**

<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>3</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>15</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>15</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>15</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>16</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>19</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>20</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>20</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>21</b>

## MARCO TEÓRICO

Los diversos genotipos del virus del papiloma humano están ampliamente distribuidos en la naturaleza; infectan piel y mucosas en sus hospederos naturales (humanos, mamíferos y aves), produciendo desde lesiones proliferativas benignas con regresión espontánea hasta carcinomas. El virus del papiloma humano (VPH) es el agente etiológico responsable de la infección por transmisión sexual con mayor prevalencia en el mundo, además de ser la causa en el tracto genital femenino de la neoplasia intraepitelial cervical, cuya ominoso corolario es el carcinoma del cuello uterino (1, 2).

El impacto del VPH surgió por el conocimiento de su potencial oncogénico y su asociación con tumores humanos, principalmente con el carcinoma epidermoide del cuello uterino. Esta entidad nosológica representa la segunda enfermedad neoplásica maligna más frecuente en el mundo en féminas, después del cáncer de mama, aunque en países en vías de desarrollo constituye la principal causa de muerte por cáncer. Su etiología infecciosa y forma de transmisión sexual se sospechó y describió desde 1842, cuando el médico italiano *Rigoni-Stern* notó mayor frecuencia en la incidencia de neoplasias en cérvix en prostitutas que en monjas. A mediados de 1970, *Harald zur Hausen* y colaboradores publicaron los primeros datos sugiriendo la asociación etiológica entre displasias y carcinomas del cuello uterino con la infección del VPH (1). En 1995 la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC, *Lyon*, Francia), perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS), estableció que ciertos tipos de VPH, denominados de alto riesgo, son carcinogénicos en el humano. En términos de salud pública, dicho señalamiento significó la apertura y promoción de la detección viral en el campo clínico, abriendo nuevas posibilidades en las áreas de prevención a través del desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas contra VPH (3).

El VPH no posee envoltura, sino una cápside proteica de simetría eicosaédrica, compuesta por 72 subunidades denominadas capsómeros. La cápside está

formada por dos proteínas estructurales, la proteína principal L1 y la proteína menor L2. La primera constituye el 75% del contenido proteico total con propiedades antigénicas comunes a la familia, mientras que la segunda es más específica (4).

El genoma está formado por una molécula de ADN de doble cadena circular, covalentemente cerrada, conocido como episoma. El ADN del VPH contiene alrededor de 8000 pares de bases (pb) con un peso molecular de  $5.2 \times 10^6$  daltons. Toda la información genética de estos virus está contenida sólo en una de las cadenas de ADN apareadas. El ADN viral está combinado con histonas (que son proporcionadas por el hospedero), compactado en un cromosoma pequeño (microsoma) (4).

Todos los tipos de ADN secuenciados de VPH evidencian una gran similitud en su organización genómica. Poseen diez marcos de lectura abiertos diferentes; cada uno de ellos representa un gen viral que codifica una proteína responsable de características biológicas tales como rango de hospedador, el tropismo celular y la patogenia de la infección. El genoma se divide en tres regiones: la región larga de control (LCR por sus siglas en inglés), la región temprana (E, por sus siglas en inglés, *early*) y la región tardía (L, por sus siglas en inglés, *late*); éstas dos últimas deben su nombre al momento en que se expresan durante el ciclo replicativo del virus (4, 5).

La LCR (conocida también como región no codificadora), representa el 15% del genoma viral. Es responsable de regular la replicación viral y controlar la transcripción de algunas secuencias de la región E, ha sido correlacionada con cambios en la virulencia y el potencial oncogénico (4, 5).

La región E es un largo segmento que representa alrededor del 45% del genoma viral. Contiene al menos siete marcos de lecturas abiertos nombrados de acuerdo a su tamaño relativo, por lo que el número asignado no guarda relación con su

ubicación en el genoma. Codifica proteínas involucradas en la transcripción viral (E2), la replicación del ADN viral (E1 y E2), la proliferación celular (E5, E6 y E7), la transformación celular (E6, E7) y probablemente, en su capacidad de infectar (E4) (4, 5).

La región L comprende aproximadamente el 40% del genoma viral y contiene dos marcos de lectura abiertos imprescindibles para la formación de la cápside viral(4, 5).

Los virus papiloma se designan de acuerdo a la especie que infectan; por ejemplo, virus del papiloma humano, virus del papiloma bovino, etc. Se clasifican en genotipos sobre la base del grado de homología de las secuencias nucleótidas de su ADN con prototipos establecidos. El número asignado es correlativo al orden de descubrimiento. En el humano se han descubierto más de 200 tipos(4).

Los VPH que infectan el tracto anogenital son alrededor de 40 tipos y se han subdividido en dos grupos con base a su potencial oncogénico, los de bajo riesgo (6, 11, 42, 43 y 44), comúnmente presentes en las lesiones benignas (condilomas y neoplasias intraepiteliales de bajo grado) con mínimo riesgo de progresión maligna (5); y los de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82), presentándose en forma de infección latente pueden conducir al desarrollo de neoplasias malignas(5).

El virus penetra a través de microabrasiones y accede a las capas basales del epitelio. Estas son las únicas células del epitelio exocervical capaces de dividirse, por lo que constituyen el blanco obligado del virus. Una vez ingresado y descapsidado, el genoma viral migra hacia el núcleo celular. Así se establece la infección que puede ser latente o productiva.

Posterior a la inoculación, se estima que existe un periodo muy variable que oscila entre 1 y 8 meses, conocido como latencia. El virus está presente en las células

pero no manifiesta cambios celulares. El genoma viral se replica solo cuando la célula basal infectada se divide y lo hace en forma autónoma, siendo distribuido de forma homogénea en las células hijas y manteniendo un bajo número de copias.

El virus comienza a reproducirse en forma independiente de la división celular y produce un alto número de copias mediante la expresión de genes tempranos, en la capa basal del epitelio. A medida que el epitelio se va diferenciando, el virus inicia la expresión de los genes tardíos en las capas superficial e intermedia, mediante la síntesis de las proteínas de la cápside viral. El ensamblado de los genomas y las cápsides dan lugar a las partículas virales completas o viriones, por lo que esta forma de infección resulta altamente transmisible. Durante este proceso el VPH no destruye a la célula infectada, sirviendo ésta como vector de la infección. La fase productiva tendrá una expresión morfológica ya sea como neoplasia intraepitelial de bajo (NIBG) o de alto grado (NIAG) (5, 6).

Los carcinomas del cuello uterino están precedidos por la infección con VPH de alto riesgo en el 100% de los casos, principalmente los tipos 16 y 18. Esto ha sido corroborado también en líneas celulares humanas, provenientes de carcinomas de cérvix, tales como la que contiene secuencias de VPH 18 y CaSki, y SiHa con secuencias de VPH 16. Se considera, por lo tanto, que la infección persistente con VPH de alto riesgo es condición necesaria para el desarrollo de cáncer (7).

Los VPH poseen oncogenes virales (E6 y E7), considerados los genes más importantes en la estimulación de la proliferación y transformación celular. El potencial oncogénico de los VPH de alto riesgo (principalmente 16 y 18) radica en la capacidad de integrar su ADN al genoma de la célula huésped. Esto se lleva a cabo posterior a la ruptura del gen E2 y el descontrol de E6 y E7; las cuales, tienen la capacidad de interferir con las funciones protectoras de p53 y del gen Rb (gen del retinoblastoma) a nivel del ciclo celular favoreciendo la proliferación neoplásica. El mecanismo de carcinogénesis por VPH implica la expresión de dos oncogenes virales, E6 y E7. Una vez integrados en el genoma del huésped intervienen con genes supresores que controlan el ciclo celular. Así, al unirse E6

con p53 se interrumpe el proceso de respuesta celular para reparar los daños que se produzcan en la cadena de ADN, alterando el proceso de apoptosis; además E6 también activa la telomerasa favoreciendo la inmortalización en las células humanas. El oncogén E7, por otra parte, causa proliferación celular no controlada al unirse a la proteína Rb. Otro mecanismo es la capacidad de E6 para estimular a enzimas de tipo telomerasa, conduciendo a una proliferación celular indefinida (6, 7, 8, 9).

Por la enorme capacidad oncogénica del VPH y los amplios estudios existentes en su carácter etiológico de carcinoma cervicouterino, es necesario ampliar el escenario clínico en su patogenia de diversos tipos de cáncer, en lo que concierne a este estudio como causante de lesiones en la mucosa anal de hombres que tienen sexo con hombres (HSH) especialmente por su similitud al cáncer de cérvix en la fisiopatología que perpetúan el daño del epitelio anal. (9)

El VPH al ser la infección de transmisión sexual más común en el mundo es una causa de morbimortalidad sustancial tanto en hombres como mujeres, lo cual genera un considerable impacto económico, social y en salud pública. A pesar de que muchas de estas lesiones son asintomáticas y se localizan como condilomas anales o vaginales, por lo anterior se puede visualizar su alcance patológico como displasia y/o lesión neoplásica. Los VPH-alto grado (VPH-AG) mencionados previamente tienen como característica común los factores de riesgo para ambos sexos: primera relación sexual a edad temprana y alto número de parejas sexuales a lo largo de su vida, por lo que esto conduce una alta prevalencia de transmisión así como de recurrencia tanto mujeres u hombres que coinfectan a su pareja, como en HSH. (10)

En un estudio mexicano de Parada y cols se analizaron hombres y mujeres (parejas al momento) con antecedente de relaciones sexuales con trabajadoras sexuales y uso inadecuado de preservativo (riesgo aumentado para VPH). Se encontró una prevalencia de 20% de VPH en hombres con los tipos 59,18, 39 y 16



de VPH detectados, y 13.7% de prevalencia en sus parejas femeninas actuales con los tipos de VPH 59,16,31,52 y 58, además de algunos genotipos de bajo riesgo. La distribución general de VPH fue similar entre hombres y mujeres demostrando la concordancia de la coinfección del virus para sus actuales parejas, al resultar positivas al menos a un genotipo de VPH. El estudio obtuvo resultados similares a otros estudios de prevalencia en parejas heterosexuales. (11,12)

Además de lo anterior, se ha detectado que la prevalencia de VPH se inclina hacia VPH-AR concordando con datos publicados internacionalmente. El otro hallazgo que ha resultado homogéneo es el hallazgo de VPH genotipo 16 como el más frecuente, seguido (para México) por los tipos 6, 11 y 18, destacando que dichos tipos son los mismos a los detectados en población femenina con lesión preneoplásicas en cérvix. (13)

Se ha establecido que el VPH es causa etiológica de varios tipos de cáncer en el área aéreo-digestiva superior y el tracto anogenital. Tan solo en Estados Unidos la incidencia del cáncer anal ha aumentado de 0.5 por 100 000 en 1974 a 1.3 por 100 000 para 2004, siendo el cáncer en hombres más comúnmente diagnosticado asociado a VPH. Se contabiliza que incluso del 85-93% de los casos mundiales de carcinoma epidermoide anal son atribuidos al VPH, siendo la causa más común los tipos 16 y 18 de VPH-AR; esto resulta notable ya que estos mismos tipos de alto riesgo representan aproximadamente el 70% del cáncer cervical. La incidencia para cáncer anal es mayor en HSH y aún más en hombres infectados por el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH); alcanzando un riesgo aumentado para cáncer anal de 37.9 en hombres con VIH y 59.5 para HSH. (14, 15)

El grupo más expuesto y con mayor riesgo de contraer VPH-AG con desarrollo ulterior de lesión maligna son los hombres VIH+ y que además mantienen relaciones sexuales con hombres. Cerca del 90% de los HSH VIH+ a lo largo de su vida contraen VPH-AR, una alta prevalencia; además, también se ha reportado que la prevalencia de múltiples tipos de VPH-AG entre los HSH con VIH es muy alta,

casi el 60%. El carcinoma anal es considerado un tumor oportunista, aunque no forma parte de la definición SIDA, en contraste con el carcinoma cervical, que se convirtió en una condición definitoria del SIDA. (16)

Hombres que se encuentran infectados con VIH HSH tienen un riesgo relativo 37 veces mayor de desarrollar carcinoma anal en comparación con la población general, incluso se ha cuantificado un riesgo relativo 60 veces mayor para desarrollar neoplasia intraepitelial anal como precursor de carcinoma anal, con la desventaja de que la terapia HAART para SIDA parece no influir en la infección por VPH y su evolución a lesión intraepitelial; por el contrario, la supervivencia prolongada junto con la inmunodeficiencia persistente bajo el tratamiento HAART, parece promover el desarrollo de VPH hacia displasias epiteliales. (17)

Aunque el mecanismo de interacción entre VIH y VPH no se conoce por completo, se teoriza que existe deficiencia de respuesta inmune mediada por células contra VPH, la interacción entre células infectadas por VIH y queratinocitos infectados por VPH pueden conducir al aumento de expresión de citocinas como IL-6 y factores de crecimiento que promueven la expresión génica de VPH. Otro mecanismo de interacción puede ser que el VIH-1 Tat aumenta la expresión de los oncogenes de VPH E6 y E7 en queratinocitos infectados. Estas proteínas conducen a la inactivación de las proteínas supresoras de tumores p53 y pRB e inducen la inestabilidad cromosómica que conduce, en última instancia, a la transformación maligna. (17)

La neoplasia intraepitelial anal (NIA) se clasifica en tres grados en función de la extensión de las células displásicas: NIA1 describe la afectación del tercio inferior de la epidermis; NIA2 los dos tercios inferiores, y NIA3 todo el espesor de la epidermis. De la misma manera que el cáncer de cérvix, el carcinoma anal se desarrolla con mayor frecuencia en la zona de transformación entre el epitelio escamoso y el columnar del canal anal. El VPH infecta células escamosas interactuando por medio de la expresión génica del virión y los genes reguladores

del crecimiento celular, conduciendo a una pérdida de la diferenciación y la proliferación clonal. Dichas células tienen un patrón de transformación celular escalonado que conduce desde el epitelio escamoso normal, displasia de bajo y alto grado y carcinoma invasivo. Esta transformación celular que se asocia al VPH se caracteriza por un patrón cíclico de proliferación celular y regresión. Por lo que una lesión puede progresar a displasia de bajo grado y regresar a tejido normal. La aparición de NIA sucede cuando una línea celular rompe su patrón cíclico y progresa hacia enfermedad invasiva. Estos cambios ocurren en ausencia de infiltrados inflamatorios, la infección por VIH puede crear un entorno estructuralmente e inmunológicamente permisivo para el evento iniciador del carcinoma anal, que es una infección por VPH de alto riesgo. (18,19)

En estudios previos se evidenciaron las diferencias microanatómicas (definidas por histología e inmunohistoquímica) entre la zona de transformación escamocolumnar anal - prácticamente desconocida hasta aquel entonces - y la correspondiente al cérvix. Mientras que en ésta última existe una monocapa de células columnares CK7+ que abruptamente sufre metaplasia y da lugar al epitelio estratificado no queratinizado, en el ano la zona de transformación está constituida por múltiples capas de células epiteliales con gradiente en la expresión de CK7 y p63, donde las basales son CK7-/p63+ y conforme madura verticalmente el epitelio cambian su expresión para cambiar a CK7+/p63-. Importante señalar que las células basales CK7-/p63+ no están confinadas a la zona de transformación sino que se distribuyen en toda la región del ano (desde la mucosa rectal distal hasta la piel perianal) (20), y esta topografía explica la importancia del muestreo total para evaluación citopatológica de la región del ano, ya que toda es susceptible al desarrollo de carcinoma epidermoide y su escrutinio oportuno tras una recolección adecuada (21)(22)(23).

En la mayoría de los casos las infecciones por VPH son subclínicas (en fase latente) y de difícil diagnóstico por examen citológico, histopatológico o por técnicas de inmunohistoquímica. Por esta razón los métodos moleculares como la

reacción en cadena de la polimerasa (PCR), son recomendados para el tamizaje. Se pueden utilizar pruebas como sondas de hibridación o ELISA para aumentar la sensibilidad y especificidad de los productos de PCR, las que al ser combinadas con el uso de enzimas de restricción y secuenciación, identifican los distintos genotipos virales.

Existen aplicaciones del estudio del ADN del VPH (10, 11) entre las que se consideran 1) hombres con discordancia en los diagnósticos citología, histología y anoscopia, 2) discernimiento de anomalías epiteliales: células epiteliales atípicas de significado incierto (ASC-US, ASC-H). 3) orientación terapéutica y de seguimiento que permite discriminar aquellos pacientes con neoplasia intraepitelial anal de bajo grado con mayor riesgo de progresión a neoplasia de mayor grado así como el tratamiento a recibir, 4) control pos tratamiento, en el que la presencia viral en el tejido posterior al tratamiento constituye un factor de riesgo de recurrencia, ya que se considera como marcador de enfermedad residual o recidiva temprana, 5) complemento del tamizaje primario de lesiones precursora en conjunto con citología anal y 6) investigación de la prevalencia por tipo específico de virus de papiloma humano a nivel regional que provea valores de comparación con la información global del VPH y el impacto de las vacunas anti-VPH.

La presencia de VPH puede establecerse por morfología, serología y estudios clínicos. En la actualidad la hibridación de ácidos nucleicos y amplificación de ácidos nucleicos están disponibles entre los que se encuentran ensayos de hibridación de ácidos nucleicos, Ensayos de amplificación de señales, métodos de amplificación de ácidos nucleicos, PapilloCheck, y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).(24, 25, 26, 27)

Inicialmente, técnicas como Southern blotting, hibridación in situ y la hibridación cromógena fueron utilizadas en la detección del VPH en tejido cervical. Las desventajas que mostraron estas técnicas incluían la baja sensibilidad, necesidad

de grandes cantidades de ADN purificado y consumían demasiado tiempo en su procesamiento.

### **Ensayos de amplificación de señales**

En la actualidad se utilizan kits comerciales para captura de híbridos, cuyo método se basa en la amplificación de señales no radioactivas de ADN de VPH para sondas de ARN marcadas en solución. Estas pruebas detectan 13 tipos de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y de bajo riesgo (6, 11, 42, 43 y 44). La ventaja de esta prueba es que confirma la presencia de infección por virus de bajo o alto riesgo pero no los identifica por genotipo.

### **Métodos de amplificación de ácidos nucleicos**

#### **Análisis de microarreglos**

Este método se basa en la amplificación de productos obtenidos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los cuales son hibridados dentro de un chip y posteriormente el producto de la hibridación del ADN es analizado en un scanner para el chip, el cual se lleva a cabo mediante equipos automatizados que pueden realizar análisis paralelos múltiples de ADN. En la actualidad el mayor uso de microarreglos de ADN está presente en el análisis de perfiles de expresión génica y análisis de mutaciones.

#### **PapilloCheck**

Este ensayo detecta y analiza genotipos mediante el uso de PCR multipunto con amplificación de primers fluorescentes de 350 pb mediante chips. La principal ventaja de PapilloCheck es la identificación y detección de múltiples infecciones; sin embargo, su costo es elevado y requiere de tecnología específica.

#### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Las técnicas de PCR son altamente sensibles, específicas y de fácil uso. En la PCR convencional, una polimerasa de ADN termoestable reconoce y extiende un

primer de par de oligonucleótidos de la región a estudiar. Al final del proceso, la PCR puede generar un billón de copias de una cadena doble de ADN después de 30 ciclos de amplificación.

El consenso para protocolos de PCR-VPH recomiendan el uso de primers como PGMY09/PGMY1 y GP5+/GP6+, que permiten la amplificación de un gran número de genotipos de VPH en una sola reacción. Los primer blanco conservan regiones del genoma del VPH como el gen L1 de la cápside viral. Después de la amplificación, los genotipos de VPH pueden ser determinados separándolos, usando técnicas como la restricción de longitud de fragmentos de polimorfismo (RFLP por sus siglas en inglés), ensayos lineales, secuenciación directa o primers específicos para cada genotipo.

Estas técnicas de PCR también tienen algunos inconvenientes, principalmente en la competencia por los reactivos, lo que conduce resultados falsos negativos para infecciones múltiples que contienen números de copias más bajos, ya que en este caso el método PCR puede no detectar todos los VPH que están presentes en la muestra. Por otra parte puede amplificar muestras con ADN de más de un genotipo, lo que dificulta la detección de los mismos y adicionalmente se debe emplear secuenciación.

La determinación del genotipo viral por PCR-RFLP permite tipificar el VPH, es una herramienta más fácil y menos costosa que la secuenciación (4). El método es simple y robusto, no requiere una tecnología de punta y es especialmente adecuado para los laboratorios con recursos financieros limitados.

Mediante la técnica de PCR en tiempo real se puede obtener un diagnóstico fiable, sensible y específico. Es ideal para la identificación de genotipos virales en tejido y muestras celulares. Tiene varias ventajas como lo son la gran capacidad para detectar carga viral, la identificación de diferentes ácidos nucleicos blanco mediante fluorocromos, y la detección de concentraciones muy pequeñas

utilizando rango dinámico para extrapolar la carga/concentración viral sobre la curva estándar y d) es reproducible y aplicable a diversas muestras.

A pesar de que el estudio histológico de las biopsias cervicales es considerado el "estándar de oro" para el diagnóstico, existe una significativa variabilidad inter e intra-observador. Recientemente se han investigado nuevos biomarcadores que pueden distinguir infecciones por VPH transitorias de aquellas que causan transformación a una lesión mayor y predecir la intensidad de la enfermedad (28).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las lesiones intraepiteliales asociadas con infección por virus del papiloma humano son altamente prevalentes en los sujetos varones que mantienen coito anal con personas del mismo sexo. La progresión a carcinoma epidermoide invasor en la región del ano, si bien es infrecuente, supone un evento ominoso que condiciona el empeoramiento en la calidad de vida de los pacientes a quienes aqueja, más aún si se asocia con comorbilidades, como la infección por VIH, tal cual es el caso la mayoría de los individuos en este grupo. La detección oportuna de lesiones preneoplásicas en la región del ano mediante escrutinio citológico es una herramienta de tamizaje que está en desarrollo, así como su correlación con los hallazgos en tejido sometido a procesamiento para su estudio histopatológico y la tipificación de los genotipos involucrados.

## **JUSTIFICACIÓN**

Si bien ya se han realizado estudios transversales y retrospectivos en México para la evaluación de material citológico e histopatológico de lesiones de la región anal, el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” cuenta con un grupo multidisciplinario de médicos que estudia a pacientes HSH, quienes son tamizados de manera protocolizada para la detección oportuna de neoplasias anales. Asimismo, existe la posibilidad de realizar la tipificación de los genotipos de VPH (de bajo y alto riesgo) involucrados en la patogenia, lo cual incrementaría la eficiencia diagnóstica.

## **HIPÓTESIS**

La adecuada interpretación de la citología anal en búsqueda de lesión intraepitelial anal correlaciona con el hallazgo histopatológico de neoplasia asociada con infección por VPH de alto riesgo.



## MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio: Retrospectivo

Se realizó una búsqueda en el archivo del Departamento de Anatomía Patológica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” de los años comprendidos entre 2010 y 2016, y en un primer filtro se seleccionaron aquellas biopsias de la región del ano (o mapeos anales) con antecedente de haber sido tamizados mediante citología anal y cuyo resultado diagnóstico hubiese sido:

- Condilomas y/o condiloma acuminado y/o condiloma plano y/o neoplasia intraepitelial anal de bajo grado (NIA 1).
- Neoplasia intraepitelial anal de alto grado (NIA 2).
- Neoplasia intraepitelial anal de alto grado (NIA 3)/ carcinoma epidermoide in situ.
- Carcinoma epidermoide invasor.

Se recabaron 265 reportes con los criterios anteriores correspondientes a 114 pacientes, de los cuales 196 fueron diagnosticados como condilomas y/o NIA1, 48 como NIA 2, 16 como NIA 3 y 5 como carcinoma epidermoide invasor. Se obtuvieron los nombres y registros de los pacientes para la búsqueda intencionada de información clínica.

En un segundo filtro se consideró que el material biológico existiera en el archivo de patología (laminillas y bloques de parafina), pudiéndose recuperar el material histopatológico completo de 38 casos: 22 correspondientes a NIA 1, 9 a NIA2, 4 a NIA 3 y 3 a carcinoma epidermoide invasor.

Como grupo control se seleccionaron 13 casos de biopsias o muestras de piezas quirúrgicas de la región anal sin alteraciones histológicas en el revestimiento epitelial.

Obtención de la muestra:

FIJACIÓN: Se recibieron muestras en formalina.

BLOQUES DE PARAFINA: Para la inclusión en parafina el tejido es encapsulado y pasa por las siguientes soluciones:

Alcohol al 80% durante 2 horas

Alcohol al 96% durante 2 horas

Alcohol-xilol durante 2 horas Xilol durante 2 horas

Alcohol al 100% durante 2 horas Parafina durante 2 horas

TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA

Se sumergen los preparados histológicos (3 mm) en xilol para eliminar los excesos de parafina. Luego pasan por una serie de alcoholes (100°, 95° y 70°). Se lava en agua para eliminar exceso de alcohol. Se sumerge en hematoxilina por 10 minutos, luego se lava en agua para eliminar excesos y se pasa rápidamente por alcohol ácido. Se lava nuevamente. Se sumerge 30 segundos en eosina. Se pasa por otra serie de alcoholes, en orden creciente (70°, 95° y 100°). Finalmente se deja remojar 10 minutos en xilol, antes de realizar el montaje final

PCR tiempo real para VPH

Para la evaluación de los genotipos 6, 11, 12, 16, 18, 31, 33 y 45 de VPH, utilizamos ADN el cual se extrae de los bloques de parafina para esto es necesario limpiar con solución RNaseZAP al microtomo y el bloque de parafina, si el bloque de parafina contiene tejido de 1 cm<sup>2</sup> se toman 8 mm de tejido y se colocan dentro de un tubo nuevo y estéril de polipropileno de 1.5 ml. El tejido es hidratado con 2 baños de xilol, 2 baños alcohol etílico absoluto, se elimina el sobrenadante y se deja secar el botón a temperatura ambiente por 15 min.

El tejido se hidrata con buffer Tris-HCl, se adiciona 60 ml de proteinasa K e incubar toda la noche a 37°C, para llevar a cabo la extracción de ácidos nucleicos se adiciona 500 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico se homogeniza y centrifugar a 14000rpm por 10 min, la fase acuosa se transfiere a un tubo nuevo de polipropileno y adicionar 500 µl cloroformo-alcohol isoamílico se homogeniza y centrifugar a 14000rpm, la fase acuosa se transfiere a un tubo nuevo de

polipropileno el cual contiene etanol etílico y acetato de sodio e incubar por 1 hr a -20°C. El tubo se centrifuga a 14000rpm, el sobrenadante se elimina y se lava el botón con etanol al 70%. Centrifugar a 14000rpm eliminar el sobrenadante y el botón se seca a temperatura ambiente por 10 minutos y resuspende en 50 ml de agua e incubar por 1 hr a 37°C, cuantificar en un nanodrop tomar lectura de A260, A280 para calcular concentración y pureza.

Concentración para DNA:

50 X lectura de A260 = concentración en nanogramos/ l

Pureza

Evaluación de calidad

$A260/A280 \geq 1.8$  hasta 2.5

40

Se realiza un PCR de gen constitutivo en base a BIOMED2. utilizando 100 ng de DNA, los cuales se colocan en un tubo de polipropileno de 200 l el cual contiene 10.5 l de agua y 12.5 ml de master mix Qiagen, además de 50 pmol de cada primer se homogeniza y se coloca en un termociclador Veriti Applied Biosystems, con el siguiente programa 1 ciclo de 95°C-5 min, 35 ciclos de 95°C-1 min, 60°C-1 min y 72°C-1 min, 1 ciclo de 72°C-5 min. El producto de PCR se corre en un gel de agarosa al 3% con SyBr Green (Molecular probes), en TAE 1X a 90 volts por 60 min. Pasado el tiempo se observa en un analizador de imagen Gel Doc XR+ BIO-RAD.

Se valora la presencia o ausencia de bandas generalmente fragmentos con los siguientes tamaños: 100, 200, 300 400 y 600 pb, lo que es indicativo de una buena calidad de DNA para poder amplificar VPH.

## RESULTADOS

Se reevaloraron las laminillas de los casos - tanto el material de citología como de histopatología - por dos patólogos, los cuales no tuvieron acceso al diagnóstico previamente emitido.

La correlación citohistológica (concordancia entre la lesión hallada por citología con la neoplasia evidenciada mediante histología) fue del 100% para lesiones intraepiteliales anales de alto grado con NIA3/carcinoma epidermoide in situ y carcinoma epidermoide invasor, mientras que a correspondiente a lesiones intraepiteliales de bajo grado fue del 74%; en aquellas citologías que no se informó lesión de bajo grado con evidencia histológica de NIA 1 el tamizaje arrojó en el 90% de los casos la categoría de células epidermoides atípicas de significado incierto, lo cual corresponde a una interpretación mitológica que alerta sobre la alta posibilidad de la presencia de neoplasia aún sin los hallazgos fehacientes de la misma; el resto correspondió a material limitado para diagnóstico (ausencia de células columnares y de metaplasia, desecación).

La tipificación de los genotipos para VPH mostraron la presencia de los genotipos de alto riesgo (16,18 y 31) como los más frecuentes en relación al desarrollo de neoplasia intraepitelial de alto grado (NIA2) así como de NIA 3/carcinoma epidermoide in situ y carcinoma epidermoide invasor.

## **DISCUSIÓN**

En el presente trabajo fue posible realizar por primera vez en nuestro país la tipificación de los genotipos involucrados en el desarrollo de lesiones intraepiteliales asociadas con infección por virus del papiloma humano en HSH; dicha tarea, ya realizada en otros países, es obligatoria en centros de atención especializada a pacientes con los factores de riesgo descritos para la adquisición de dicha enfermedad, ya que permite evitar la subrepticia morbilidad que condiciona. El amalgamamiento de las piezas de información obtenidas en los tres niveles biológicos estudiados (molecular, celular y tisular), mandatorio en el abordaje diagnóstico del médico patólogo, dilucida a través de los hallazgos obtenidos, si bien sobrios dada la limitación numérica de la muestra, la posibilidad de asegurar que mediante el estudio aislado de sólo una de las modalidades aproxima, en la mayoría de los casos mediante inferencias bien fundamentadas, el resultado de las otras dos, con las implicaciones terapéuticas - e incluso, monetarias - que pudiere conllevar.

## **CONCLUSIÓN**

Es necesario estandarizar los criterios para lograr que la citología anal se convierta en un método de tamizaje obligatorio para los pacientes con factores de riesgo que requieran de la vigilancia adecuada, tal cual ocurre con la citología cervical, ya que representa un método barato que correlaciona casi de manera absoluta con las lesiones intraepiteliales originadas por genotipos de VPH de alto riesgo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Zur Hausen H, et al. "Papillomavirus infection-a major cause of human cancers". *Biochim Biohys Acta* 1996; 1288: F55-578.
2. Razmpoosh M, Sansregret A, Oligny LL, , et al. Assessment of correlation between p16INK4a staining, specific subtype of human papillomavirus, and progression of LSIL/CIN1 lesions: first comparative study. *Am J Clin Pathol.* 2014;142, 1:104-10.
3. IARC Working Group "Human Papillomavirus. Monograhps on the evaluation of carcinogénesis risks to humans". International Agency for Research on Cancer (IARC), Woorl Health Organization (WHO), Lyon, 1996; vol 64.
4. Knipe DM, Howley P. Papillomaviruses. In *Fields Virology*, 5th edición. BN Fields, DM Knipe, PM Howley (eds). New York. Lippincott-Raven Publihers, Philadelphia 2007; p. 2300-54.
5. Munger K, Baldwin A, Edwards KM, et al. "Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogénesis". *J Virol* 2004; 78:11451-60.
6. Christian Kranjec, John Doorbar "Human papillomavirus infection and induction of neoplasia: a matter of fitness. *Virology* 2016, 20:129–136
7. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, et al. "Prevalence of human papillomavirus in cervical cáncer: a worldwide perspective". *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87: 796-802.
8. Mark Schiffman, John Doorbar, Nicolas Wentzensen, et al. "Carcinogenic human papillomavirus infection" *Nature review Dis Primer.* 2016; 2: 1-20.

9. Denise A Galloway and Laimonis A Laimins. "Human papillomaviruses: shared and distinct pathways for pathogenesis". *Current Opinion in Virology* 2015, 14:87–92.
10. López Diez E, Pérez S, Iñarrea A, de la Orden A, Castro M, Almuster S, et al. Prevalence and concordance of high-risk papillomavirus infection in male sexual partners of women diagnosed with high grade cervical lesions, *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017; 35(5):273-277.
11. Parada R, Morales R, Giuliano AR, Cruz A, Castellsagué X, Lazcano-Ponce E. Prevalence, concordance and determinants of human papillomavirus infection among heterosexual partners in a rural region in central Mexico, *BMC Infect Dis*. 2010; 10:223.
12. Lorenzon L, Terrenato I, Donà MG, Ronchetti L, Rollo F, Marandino F, et al. Prevalence of HPV infection among clinically healthy Italian males and genotype concordance between stable sexual partners, *J Clin Virol*. 2014; 60(3):264-9.
13. Guzmán P, Ili C, Rifo P, Briceño G, Araya J, Villaseca M, Roa JC. Prevalence of human papillomavirus genital infection among male university students, *Rev Med Chil*. 2008; 136(11):1381-9.
14. Giuliano AR, Anic G, Nyitray AG. Epidemiology and pathology of HPV disease in males, *Gynecol Oncol*. 2010; 117(2 0): S15–S19.
15. Johnson C, Obanor N y DeWeese A. Human Papillomavirus and Cancer in Men, *Health Science Journal*, 2016; Vol.10 No.6:479
16. del Amo J, González C, Geskus RB, Torres M, Del Romero J, Viciano P, et al. What drives the number of high-risk human papillomavirus types in the anal canal in HIV-positive men who have sex with men?, *J Infect Dis*. 2013; 207(8):1235-41.
17. Kreuter A, Brockmeyer NH, Altmeyer P, Wieland U. Anal intraepithelial neoplasia in HIV infection, *JDDG*; 2008; 6:925–933.
18. Leeds IL, Fang SH. Anal cancer and intraepithelial neoplasia screening: A review, *World J Gastrointest Surg*. 2016 Jan 27; 8(1):41-51.

19. Wasserman P, Rubin DS, Turett G. Review: Anal Intraepithelial Neoplasia in HIV-Infected Men Who Have Sex with Men: Is Screening and Treatment Justified? *AIDS Patient Care STDS*. 2017; 31(6):245-253.
20. Yang EJ, Quick MC, Hanamornroongruang S, Lai K, Doyle LA, McKeon FD, et al. Microanatomy of the cervical and anorectal squamocolumnar junctions: a proposed model for anatomical differences in HPV-related cancer risk, *Mod Pathol*. 2015; 28(7):994-1000.
21. Roberts JM, Jin F, Thurloe JK, Ekman D, Adams MK, McDonald RL, et al. The value of a transformation zone component in anal cytology to detect HSIL, *Cancer Cytopathol*. 2016 Aug;124(8):596-601.
22. Olvera-Magaña P, Ramírez-Mendoza P, Torres-Peralta JJ, Torres-Ibarra R, Cenicerós RA. Lesiones escamosas en sujetos que practican coito anal: comparación de hallazgos citológicos vs histológicos, *Patología* 2011;49(2): 132-137
23. Ruanpeng D, Chariyalertsak S, Kaewpoowat Q, Supindham T, Settakorn J, Sukpan K, et al. Cytological Anal Squamous Intraepithelial Lesions Associated with Anal High-Risk Human Papillomavirus Infections among Men Who Have Sex with Men in Northern Thailand, *PLoS One*. 2016; 11(5):e0156280.
24. André L P Abreu, Raquel P Souza, Fabrícia Gimenes et al. "A review of methods for detect human Papillomavirus infection". *Virology Journal* 2012, 9:262-71
25. Molijn A, Kleter B, Quin W et al. "Molecular diagnosis of human papiloma virus infections" *J Clin Virol* 2005; 1: S43-51.
26. Villa LL, Denny L. "Methods for detection of HPV infection and its clinical utility". *Int. J Gyn Obst* 2006, 94: 71-80
27. Hesselink AT, van Ham MA, Heideman DA, et al. "Comparison of GP5+/6+ -PCR and SPF10-line blot assays for detection of high-risk human papillomavirus in samples from women with normal cytology results who develop grade 3 cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Microbiol* 2008, 46: 3215-3221.



28. Termini L, Villa LL: Biomarkers in screening of Cervical Cancer. J Bras Doencas Sex Trasm 2008, 20: 125-131.