

Diagnóstico molecular del virus del papiloma humano por hibridación in situ por fluorescencia (fish)

* Dra.Ma.Isabel Pérez Rovalino, ** Dr. Hernán Neira Maldonado, *** Dr. Jorge Ugalde Puyol

* Bioquímica-Citogenetista

** Médico-Ginecólogo

*** Médico-Patólogo

ABSTRACTO

Estudios moleculares han demostrado que el virus del papiloma humano (HPV) es el principal agente etiológico de esta patología. El objetivo evaluar mediante técnicas moleculares: hibridación in situ por fluorescencia (FISH) la presencia del virus del papiloma humano (HPV), los hallazgos colposcópicos y su correlación histológica. Se incluyeron en el estudio 77 casos diagnosticados en el Instituto del Cáncer SOLCA-Cuenca en el período 2000-2003 con lesiones preinvasivas e invasivas de cervix. Se procedió a investigar y tipificar el HPV mediante FISH con tres tipos de sondas: 6/11 (bajo grado), 16/18 (alto grado), y 31/33 (grado intermedio).

Los hallazgos fueron los siguientes: la edad de presentación de las lesiones precancerosas se dio de la 2da a la 4ta década de vida y el cáncer invasivo en mujeres mayores de 50 años. En relación a los grupos virales con una mayor frecuencia el de alto riesgo con el 50%, bajo riesgo 37% y riesgo intermedio 12.9%. el inicio de vida sexual con mayor frecuencia de 16 a 20 años con el 61.12%. Los estudios colposcópicos muestran una correlación con los hallazgos anatomopatológicos del 84.61%.

Los resultados sugieren que la técnica FISH para determinar el tipo de HPV es un procedimiento práctico y factible con un alto grado de sensibilidad y especificidad.

Palabras claves: Virus del Papiloma Humano (HPV), Hibridación in situ por fluorescencia (FISH).

Introducción.

El cáncer cérvico uterino a pesar de ser prevenible, sigue siendo una de las más frecuentes causas de mortalidad en mujeres de Latinoamérica. La mayoría de mujeres que desarrollan cáncer cervical se encuentran en su cuarta o quinta década de su vida.⁽¹⁾

Correspondencias y Separatas:

Dr. Jorge Ugalde P.
Servicio de Patología
Instituto Oncológico de Cuenca
Av. El Paraíso y Agustín Landívar
Cuenca - Ecuador

® Los Derechos de autor de los artículos de la Revista Oncología pertenecen a la Sociedad de Lucha contra el Cáncer.

ABSTRACT

Molecular studies have demonstrated that the human papilloma virus is the main etiology agent of this pathology. The objective is to evaluate by molecular techniques, the presence of the human papilloma virus, colposcopic results, and their histo-pathologic correlation.

Between 2000-2003, 77 cases were diagnosticated at the Cancer Institute SOLCA-CUENCA with pre-invasive and invasive cervix injures. We investigated and tipificated by FISH, the three types of probes 6/11 (low grade), 16/18 (high grade) and 31/33 (intermediati grade) were used.

The results were the following: The age range of the premalignant lesion was between 20-40 years. Invasive cancer were prevalent in women older than 50 years. About the viral groups with the highest frequency is the one of high risk with the 50%, low risk 37%, and half risk 12.9%. The beginning of the sexual life with frequency is around 16 to 20 years old with the 61.12%. Colposcopic studies show a correlation with the anatomo-pathologic of 84.61%. The results suggest that the FISH technique for the HPV determination is a practice and feasible procedure, showing a high grade of sensibility and accuracy

Key word: Human papillomavirus (HPV), Flourescein in situ hybridization (FISH).

En nuestro medio el cáncer cérvico uterino tiene una incidencia de 19.8 x 100.000 habitantes y es la segunda causa de muerte luego del cáncer gástrico.⁽²⁾

Parece ser que el factor de riesgo más importante es contraer la infección del HPV.

La declaración de Consenso sobre Cáncer de Cérvix del Natitonal Institute of Health establece que este cáncer está relacionado de forma causal con la infección por el virus del papiloma humano.⁽³⁾ Desde entonces numerosos estudios epidemiológicos y moleculares han demostrado que la infección por HPV era precursora en el 95% de los cánceres cervicales.⁽³⁾



Existen mas de 80 tipos de este virus, de los cuales unos 25 afectan el tracto genital. Los subtipos de HPV se clasifican en categorías de riesgo (bajo, intermedio y alto) sobre la base de su relación con lesiones de alto grado e invasoras.^(4,5)

Virtualmente en todos los cánceres cervicales y en sus lesiones precursoras se encuentra ADN de HPV.

La citología demuestra lesiones citopáticas del epitelio, la colposcopia visualiza la lesión y la biopsia diagnóstica, considerándola como "estandar de oro" la valoración de la patología neoplásica cervical.

La biología molecular nos permite valorar los cambios genéticos en las células neoplásicas, demostrar secuencias moleculares que han determinado cambios de comportamiento celular, aspa como investigar y demostrar la presencia de secuencias de DNA o RNA que nos interesa demostrar, con diferente grado de sensibilidad, una de ellas la Hibridación in Situ mediante cromógenos y fluorescencia, nos permite ver sobre el tejido la presencia del virus o secuencias buscadas por una correlación con los hallazgos patológicos.

Objetivo.

Evaluar mediante la técnica molecular de Hibridación in situ por fluorescencia (FISH) la presencia de HPV de bajo, intermedio y alto grado, los hallazgos colposcópicos y su relación histológica, analizar factores de riesgo asociados en relación a: edad temprana de las relaciones sexuales, promiscuidad, multiparidad.

Metodología.

El principio de hibridación está basado en la distribución y localización de secuencias específicas de ADN o ARN dentro de las células o tejidos.⁽⁶⁾

La hibridación in situ por fluorescencia consiste en colocar la sonda directamente sobre el espécimen (cromosomas, citologías, secciones embebidas en parafina) que tiene la secuencia del DNA inmovilizada, el tejido tratado con una enzima permite el acceso de la sonda al DNA nucleares cual es desnaturalizado por calor. La sonda se agrega para la hibridación y esta ocurre si está presente el DNA blanco complementario de la sonda. La sonda se detecta con una reacción de fluorescencia.^(6,7)

Material y Métodos.

Se incluyen en el estudio 77 pacientes con lesiones preinvasivas de bajo, alto grado y carcinoma invasor diagnosticadas en el Instituto del Cáncer SOLCA-Cuenca en el período de agosto 2000 hasta agosto del 2003.

El estudio se realizó en tejidos bloqueados en parafina, se

utilizó sondas marcadas con fluoresceína para virus de bajo riesgo (6/11), riesgo intermedio (31,33) y riesgo alto (16/18). (Inmunogenex).

Técnica

1. Corte y desparafinado del tejido.
2. Lavado de slides con bloqueador de RNAsas.
3. Tratamiento del tejido con proteinasa K.
4. Colocación de la sonda sobre el tejido para hibridar en cámara húmeda a 90°C durante 10 minutos (tiempo de desnaturalización), luego a 37°C toda la noche tiempo en el que se realiza la hibridación.
5. La unión de la sonda es detectada por:
 - Adición del anticuerpo antibiotina antifluoresceína
 - El anticuerpo secundario biotinizado.
 - El conjugado fosfatasa alcalina streptoavidina
6. Medio de contraste fase red.
7. Proceso de deshidratación y montaje de los slides (Inmunogenex)

En la interpretación se utilizó un microscopio Zeiss Axio Plan 2 con epifluorescencia, Cámara digital Sony. La positividad está dada por la reacción de hibridación con la sonda que marca en el interior del núcleo de las células epiteliales El cuerpo viral fluorescente corresponde al virus del HPV siendo valorado en relación a cruces: + (aislado), ++ (10-30 campo), +++ (> 30 campo).

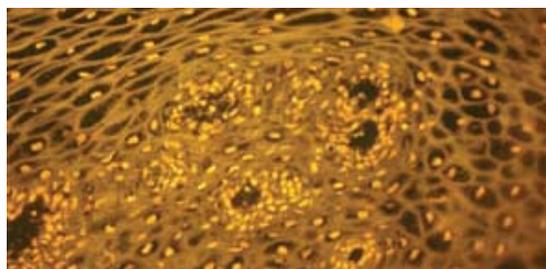


Fig 1 Biopsia de cuello uterino. Técnica de FISH positivo para HPV 16/18 +++

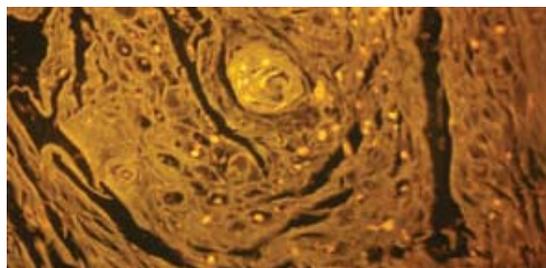


Fig 2 Biopsia de cuello uterino. Técnica de FISH positivo para HPV 16/18 +

Resultados

El grupo de estudio esta conformado por pacientes con un rango de edad de 15 a 65 años, los grupos más numerosos están entre los 20 a 30 años, con lesiones epiteliales de bajo e intermedio grado, más frecuente corresponde al 68%, los casos de alto grado representaron al 31%. Los casos de carcinoma invasor se presentan en el grupo de mujeres sobre los 50 años con 15.5%. (Cuadro 1).

Diagnóstico molecular del virus del hpv por fish. Distribución según edad y tipo de lesión Instituto del Cáncer- Solca Cuenca agosto 2002-2003

EDAD	NIC I	NIC II	NIC III	CA INVASOR	TOTAL
< 19 años	1				1
20-29 años	4	12	5		21
30-39 años	9	9	4		22
40-49 años	7	1	3		11
> 50 años	5	5	0	12	22
TOTAL	26	27	12	12	77

El estudio por hibridación mostró una positividad en toda la serie de 62 casos para una de las sondas virales de investigación, representando 80.5%; los casos negativos se presentaron al azar, en los diferentes grupos de pacientes la lesión neoplásica preinvasiva e invasiva. (Cuadro 2)

Diagnóstico molecular del virus del hpv por fish. Distribución según tipo de lesión y hpv Instituto del Cáncer- Solca Cuenca agosto 2002-2003

EDAD	NIC I	NIC II	NIC III	CA INVASOR	TOTAL
< 19 años	1				1
20-29 años	4	12	5		21
30-39 años	9	9	4		22
40-49 años	7	1	3		11
> 50 años	5	5	0	12	22
TOTAL	26	27	12	12	77

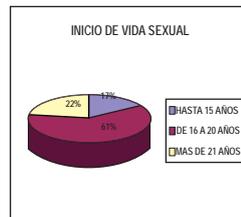
En relación a los grupos virales de bajo grado, alto e intermedio, existe frecuencia mayor del grupo de alto grado (50%), seguidos por el grupo de bajo riesgo (611) con el 37%, mientras que el grupo de riesgo intermedio representa el 12.9% (Cuadro 3).

Diagnóstico molecular del virus del hpv por fish. Resultados en porcentaje lesión vs. tipo viral Instituto del Cáncer- Solca Cuenca agosto 2002-2003

LESION	VIRUS 6/11 %	VIRUS 16/18 %	VIRUS 31/33 %	NEGATIVO %	TOTAL PACIENTES
NIC I	44.44	14.81	11.11	29.62	27
NIC II	36.00	48.00	0	16.00	25
NIC III	7.69	76.92	15.38	0	13
CARCINOMA	8.33	41.66	25.00	25.00	12

El inicio de la vida sexual valorada en tres grupos de edad, muestra la frecuencia del 61.12% entre los 16 y 20 años, con

INICIO DE VIDA SEXUAL	EDAD	NUMERO	%
HASTA 15 AÑOS		12	16.66
DE 16 A 20 AÑOS		44	61.12
MAS DE 21 AÑOS		16	22.22
TOTAL		72	100



frecuencias importantes para el grupo de mujeres adolescentes. (Cuadro 4).

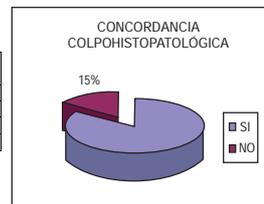
Diagnóstico molecular del virus del hpv por fish. Inicio de vida sexual Instituto del Cáncer- Solca Cuenca agosto 2002-2003

NÚMERO COMPAÑEROS SEXUALES	NUMERO	%
UNO	54	75
DOS	15	20.83
TRES O MÁS	3	4.0
TOTAL	72	100

La variable de número de compañeros sexuales mostró una frecuencia marcada en el grupo de un compañero, observándose una importante frecuencia en el grupo de dos compañeros (Cuadro 5)

Diagnóstico molecular del virus del hpv por fish. Compañeros sexuales Instituto del Cáncer- Solca Cuenca agosto 2002-2003

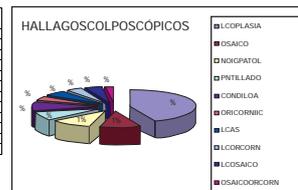
CONCORDANCIA COLPOHISTOPATOLÓGICA	NUMERO	%
SI	44	84.61
NO	8	15.39
TOTAL	52	100



Los estudios colposcópicos mostraron varios tipos de lesiones, la correlación con los hallazgos anatomopatológicos son del 84.61% (Cuadro 6).

Diagnóstico molecular del virus del hpv por fish. Concordancia colposcópica Instituto del Cáncer- Solca Cuenca agosto 2002-2003.

HALLAZGOS COLPOSCÓPICOS	NUMERO	%
LEUCOPLASIA	22	42.3
MOSAIKO	3	5.61
IMAG. NO PATOL.	5	9.61
PUNTELADO	4	7.69
CONDILOMA	4	7.69
LEUC. Y BASE	3	5.76
ORIF. COR. NIFIC.	2	3.84
LEUC. ORIF. CORN.	3	5.68
LEUC. Y MOSAIKO	2	3.84



Discusión.

El cáncer cervical puede ser la primera neoplasia humana mayor para la cual se ha identificado un factor etiológico único. Los resultados de asociación entre el HPV y la neoplasia varían en los diferentes estudios, al parecer según el método utilizado para la detección del virus con una muy buena sensibilidad por las técnicas moleculares de FISH y PCR.

La lesión precancerosa se observa de 10 a 20 años, antes de aparecer las lesiones histológicas invasivas, por lo que los estudios citológicos y moleculares constituyen un método de diagnóstico y prevención de carcinoma Cérvico-uterino ⁽⁹⁾

La más alta prevalencias de infección por HPV se han hallado en mujeres menores de 29 años, las mujeres mayores tienen menor riesgo de contraer infección por el virus, posiblemente debido a inmunidad adquirida al HPV por exposiciones pasadas.

La incidencia del cáncer invasivo aumenta considerablemente con la edad, con un pico máximo entre los 45 y 60 años ⁽⁸⁾, en el presente estudio, las pacientes con cáncer invasivo tuvieron más de 50 años.

Bosch et al, en su estudio determinan la prevalencia del ADN del HPV en tumores invasores en 1.060 biopsias en casos de carcinoma invasivo, con una frecuencia del 89 al 93% ⁽¹⁰⁾

Actualmente la infección por el HPV se considera el principal factor de riesgo para el cáncer de cérvix lo que puede hacer reinterpretar el papel de los factores clásicos que podrían actuar de forma independiente o podrían ser cofactores de la infección por HPV en la carcinogénesis.

La importancia del inicio de la vida sexual, mostró en nuestra serie que el 61% de las pacientes inician su vida sexual activa entre los 16 y 20 años. El 71% de las pacientes han tenido un compañero sexual.

De las 77 pacientes 52 se realizaron colposcopia, siendo las imágenes patológicas más frecuentemente encontradas: leucoplasia en el 42.3%, Mosaico en el 9.61%, No imagen Patológica con el 9.61%, Puntillado con el 7.69%, Condiloma con el 7.69% con una concordancia colpohistológica del 84.61%.

La progresión a cáncer de cervix viene determinado por la infección persistente por el HPV. No obstante un alto porcentaje de estas infecciones regresa espontáneamente y otro entre el 5 y 10% adquiere el estado de portadora crónica, alguna de las cuales evoluciona posteriormente a lesiones neoplásicas.

Hasta la fecha no hay forma alguna de predecir que paciente se mantendrá dentro de la misma categoría de NIC, cual progresará a alguna forma más grave de NIC o cáncer invasor y cuanto tardará en ocurrir dicha transición. ⁽¹¹⁾

La hibridación in situ por fluorescencia (FISH) permite la detección y localización de secuencias específicas de ácidos nucleicos dentro de las células o tejidos, con un alto grado de sensibilidad y especificidad.

El HPV 6/11 está asociado con lesiones benignas o de bajo riesgo como el condiloma genital y NIC menores. ⁽¹¹⁾

Mientras que el HPV 16 /18 se relaciona con un grupo de alto riesgo oncogénico como el cáncer cervical, y las formas NIC más significativas ⁽¹¹⁾, y los asociados con lesiones escamosas intraepiteliales y carcinomas invasivos divididos a su vez en un grupo de riesgo intermedio como el tipo 31/33. ⁽¹¹⁾

En el estudio realizado de los 27 pacientes diagnosticadas NIC I la mayor positividad para el HPV es para el tipo viral 6/11 con el 44.44%. De los 25 pacientes diagnosticados de NIC II su mayor positividad es para el tipo viral 16/18 con el 48%.

De las 13 pacientes con NIC III el 77% fue positivo para el tipo 16/18 de alto riesgo, la misma cepa 16/18 se encontró en el 42% de los carcinomas.

La utilización de técnicas moleculares como la Hibridación in situ por fluorescencia (FISH) para la tipificación del HPV, es un procedimiento práctico, factible con un alto grado de sensibilidad y especificidad, permite establecer la correlación entre el tipo de lesión anatómica y la presencia del genoma viral en el interior del epitelio y de las células, establecer su variedad de los tipos que tienen importancia como oncogénicos en el aparato genital femenino.

La literatura con experiencia mediante esta técnica no es abundante, nuestra observación nos permite recomendar para los casos de estudios directos sobre tejidos procesados en parafina, poder determinar la presencia y variedad del HPV correlacionando con la clínica con el fin de dar un tratamiento adecuado a cada uno de los casos.

Bibliografía

1. Robbins. Patología Funcional y Estructural. Aparato Genital Femenino 1995;5:1093-1098.



2. Registro de Tumores SOLCA-Cuenca. Tercer informe 1996-2000.
3. Patricia J. Eifel, Charles Levenback. Atlas de Oncología. Cáncer del Tratamiento Genital Femenino. 2000; 1-9.
4. med.javeriana.edu.co/publi/universitas/200/virus.PDF
5. Morrison EAB, Hogeny, Vermumnd SH. Human papillomavirus infection other risk factor for cervical neoplasia. Int J Cancer 1991; 6-13.
6. Julia M. Polar and James O'D. McGee. In Situ Hybridization, Principles Practice. Medicine Neurochemistry. 1991; 9: 125-139.
7. Ronald A. Delelles. MD. In Situ Hybridization Techniques for the Analysis gene Expression: Applications in Tumor Pathology. Human Pathology. 1999; 580-590.
8. Papanicolaou Smear. Clinicians Hand Book of Preventive Services. Ed Washington; US Government Printing, Office Junio/2000.
9. Revista del Instituto Nacional de Cancerología México. 1999; 45. 206-207.
10. Bossch Fx. El virus del papiloma Humano y los del Trato Genital Femenino. Oncología 1996; 157-164.
11. Creasman. Oncología Ginecológica Clínica Disaia. 1999;5:11-12.

Del Editor

CHEQUEO PARA LOS AUTORES, PREVIO A LA ENTREGA DE TRABAJOS

- Se requieren el original y 2 copias del manuscrito y de las ilustraciones.
- El manuscrito debe estar escrito a doble espacio.
- El último debe ser conciso y corto.
- El abstracto tendrá un máximo de 500 palabras en el caso de artículos originales, y de 100, en los reportes de casos.
- Debe incluirse la versión en inglés del abstracto.
- Especificar la filiación institucional de cada autor, incluyendo el nombre completo del autor o autores, dirección, teléfono, fax o dirección de correo electrónico.
- Cada ilustración debe estar en una página separada en la que debe indicarse (en el borde superior), el nombre del primer autor, el título del trabajo y el número del orden que le corresponde.
- Debe enviarse el certificado de exclusividad y de no tener conflicto de interés financiero relacionado al trabajo, firmado por todos los autores.
- Para la publicación del manuscrito en la revista, es indispensable el certificado de cesión de los derechos de autor.

