

Detección del virus de papiloma humano en muestras de pacientes con ectropión cervical

Dras. Zoraya De Guglielmo¹, Maira Ávila¹, Adriana Mora², Marianna Meléndez², María Correnti¹

¹Laboratorio de Genética Molecular- Instituto de Oncología y Hematología-MPPS. Caracas, Venezuela.
e-mail: zdegugli@gmail.com

²Ginecoobstetras de la Maternidad "Concepción Palacios". Caracas, Venezuela.

RESUMEN

Objetivo: Detección subclínica del virus de papiloma humano en muestras de pacientes diagnosticadas con ectropión cervical, para evaluar la prevalencia de la infección viral asociada a dicha condición.

Métodos: El ADN fue extraído utilizando solventes orgánicos (fenol/cloroformo-alcohol isoamílico). La detección del virus de papiloma humano se realizó mediante PCR con iniciadores genéricos MY09/MY11 y para la tipificación de las muestras positivas se utilizó un kit comercial de PCR múltiple.

Ambiente: Laboratorio de Genética Molecular-Instituto de Oncología y Hematología.

Resultados: Se obtuvo una positividad de 26 % (13/50 muestras analizadas) para la presencia de ADN del virus de papiloma humano. De las muestras positivas, 38,45 % resultó virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico (tipo 16 o 18), mientras que otro 38,45 % correspondió a virus de papiloma humano de bajo riesgo (tipos 6, 11 o infección mixta 6/11) y 23,07 % no pudo ser tipificado con la metodología utilizada. **Conclusión:** Aunque este resultado no fue estadísticamente significativo, señala la necesidad de mayor seguimiento clínico de las pacientes positivas, especialmente aquellos casos correspondientes a virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico, ya que presentan mayor probabilidad de desarrollar cáncer cervical.

Palabras clave: Ectropión. Virus de papiloma humano. Cáncer cervical

SUMMARY

Objective: In this study was conducted subclinical human papillomavirus detection in samples from patients diagnosed with cervical ectropion to assess the prevalence of human papillomavirus infection associated with this condition.

Methods: DNA was extracted with organic solvents (phenol /chloroform- isoamyllic). Human papillomavirus detection was performed by PCR with generic primers MY09 and MY11 and the viral typing was performed using a commercial MPCR kit.

Setting: Laboratorio de Genética Molecular-Instituto de Oncología y Hematología;

Results: The results showed that 26 % of the evaluated sample (13/50) was positive for the presence of human papillomavirus genome. Viral typing test identified high- oncogenic risk human papillomavirus (types 16 or 18) in 38.45 % of the positives cases. Likewise, 38.45 % was low oncogenic risk (types 6, 11 or mixed infection with 6/11 human papillomavirus) and 23.07 % could not be typified with the used methodology.

Conclusions: Although this result is not statistically significant, the virus latent presence highlights the need for greater medical surveillance for positive patients, especially in cases where detected 16 and 18 high-risk oncogenic human papillomavirus types, because they may have increased risk of cervical cancer.

Key words: Ectropion. HPV. Cervix. Cervical cancer

INTRODUCCIÓN

El ectropión es la presencia de mucosa endocervical en el exocérvix, incluyendo epitelio superficial, glándulas y estroma, como consecuencia de la exposición de mucosa originalmente endocervical

Instituto de Oncología y Hematología: Calle Minerva, entre Facultad de Odontología y Escuela de Educación: Ciudad Universitaria, Los Chaguaramos-Caracas, 1051.

Maternidad "Concepción Palacios": Av. San Martín, Caracas-Venezuela.

hacia el exterior (1). Morfofisiológicamente es una expresión de cambios hormonales que ocurren durante la adolescencia, en el embarazo, la menopausia y por el uso de anticonceptivos orales (2).

La principal manifestación clínica asociada al ectropión es la secreción de flujo abundante, el cual modifica el medio vaginal, neutralizando la acidez natural y favoreciendo, así, la proliferación de microorganismos con la consecuente aparición de infecciones cervicovaginales (2,3).

De esta manera, la presencia de ectropión, a pesar de no constituir una condición clínicamente patológica sino una variante de la condición normal, pudiera facilitar el establecimiento de infecciones por microorganismos como el virus de papiloma humano (VPH), *Chlamydia trachomatis* o herpes, considerados como factores o cofactores de riesgo en el desarrollo de cáncer uterino, favoreciendo que este proceso fisiológico alcance un estado patológico (4).

En el presente estudio se llevó a cabo la detección subclínica de VPH en muestras de pacientes con diagnóstico de ectropión cervical para evaluar la frecuencia de infección por VPH asociada a esta condición.

MÉTODOS

Es un estudio prospectivo y descriptivo.

Muestras: se evaluaron 50 muestras citológicas de pacientes con diagnóstico de ectropión cervical que acudieron a las consultas ginecológicas de la Maternidad “Concepción Palacios”, Caracas, las cuales no presentaron cambios citológicos, colposcópicos o histológicos sugestivos de neoplasia cervical o antecedentes de la misma. Los promedios de edad y paridad fueron de 27,16 años y 3,12 partos, respectivamente. El 94 % reportó el uso de métodos anticonceptivos.

Extracción del ADN genómico total. Para la extracción del ADN se siguió el protocolo descrito por De Guglielmo y col. (5). El sedimento celular de las muestras evaluadas fue digerido en 100 µL buffer de lisis (0,1 % sarcosina; 10 mM Tris HCl, pH 8) y 100 µL proteinasa K (1 mg/mL), incubando durante, al menos, 3 horas a 42 °C. El ADN fue extraído mediante separación v/v con cloroformo-fenol/isoamílico y precipitación con 2 ½ volúmenes de etanol absoluto frío; el ADN se resuspendió en agua libre de nucleasas y se determinó la concentración espectrofotométricamente.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La detección viral se llevó a cabo mediante PCR

con iniciadores genéricos MY09 y MY11, que reconocen la región consenso L1 del genoma viral para obtener un producto de amplificación de 450 pb (6). Se utilizaron los iniciadores PC04/GH20 para amplificar simultáneamente un fragmento del gen humano de β-globina como control interno de la integridad y calidad del ADN y ausencia de inhibidores de la PCR, con los que se obtiene un producto de 268 pb (7). Se incluyó, además, un control negativo (mezcla de reacción + ADN de individuo sano). Aproximadamente 1 µg del ADN extraído fue añadido a la mezcla de reacción [0,4 µL de cada dntp (100 mM); 0,2 µL de cada primer (100 mM); 6 µL de buffer Taq 10X; 4 µL de MgCl₂ (50 mM); 0,5 µL (2,5 U) de Taq DNA polimerasa (Invitrogen); H₂O libre de nucleasas hasta un volumen final de 40 µL] y amplificado en un termociclador “Mini cycler” MJ Research (Ciclos: 4 min a 94 °C, 40 X [15 seg a 94 °C, 30 seg a 55 °C, 45 seg a 72 °C] y una extensión final de 7 min a 72 °C).

La tipificación se realizó con el kit comercial “MPCR Kits for Human Papillomaviruses” de Maxim Biotch, Inc., siguiendo las indicaciones de la casa comercial, que permite tipificar los tipos 6 y 11 de bajo riesgo, y los tipos 16, 18 y 33 de alto riesgo oncogénico, correspondientes a los tipos virales más reportados en la literatura sobre el tema.

Los resultados de ambas amplificaciones fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, buffer TBE 1X. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0,2 µL de solución al 1 %) y expuestos a luz UV (transiluminador) para registro fotográfico.

Los resultados fueron analizados con la prueba del valor Z de la distribución normal (1,96), que permite hacer la comparación de proporciones con una significancia P<0,05.

RESULTADOS

El 26 % de la muestra analizada (13/50) fue positiva para la presencia de genoma de VPH, valor que no fue estadísticamente significativo (Z 5,47 ; P>0,05). En la tipificación, 38,45 % de los positivos en la detección resultó de alto riesgo oncogénico (tipo 16 o 18), 38,45 % resultó de bajo riesgo (tipo 6, 11 o infección mixta con tipos 6/11) y 23,07 % no pudo ser tipificado con la metodología utilizada (Cuadro 1; figuras 1, 2 y 3).

TÍTULO RESUMIDO

Cuadro 1
Resultados de la tipificación viral

Tipo viral	Nº de muestras	%
6	3	23,07
6 y 11	2	15,38
16	1	7,69
18	4	30,76
NT	3	23,07

NT: no tipificable

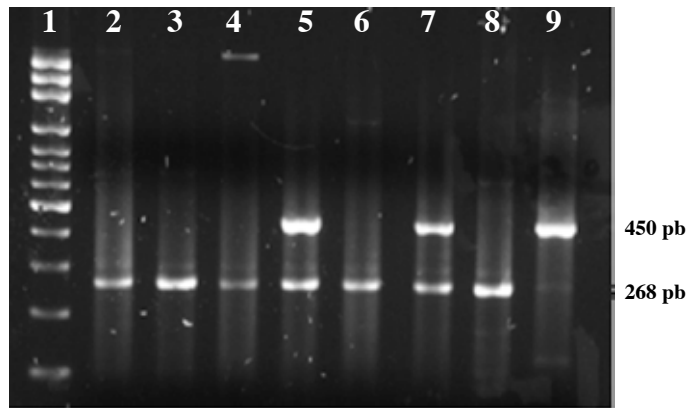


Figura 1. Detección de VPH por PCR con los iniciadores genéricos MY11/MY09. 1: marcador de peso molecular (100 bp-Invitrogen). 2-7: muestras en estudio. 8 control negativo, con la banda de 268 bp correspondiente al control interno. 9: control positivo, con la banda de 450 bp correspondiente al fragmento amplificado del genoma viral y la banda de 268 bp correspondiente al control interno (gen de β -globina).

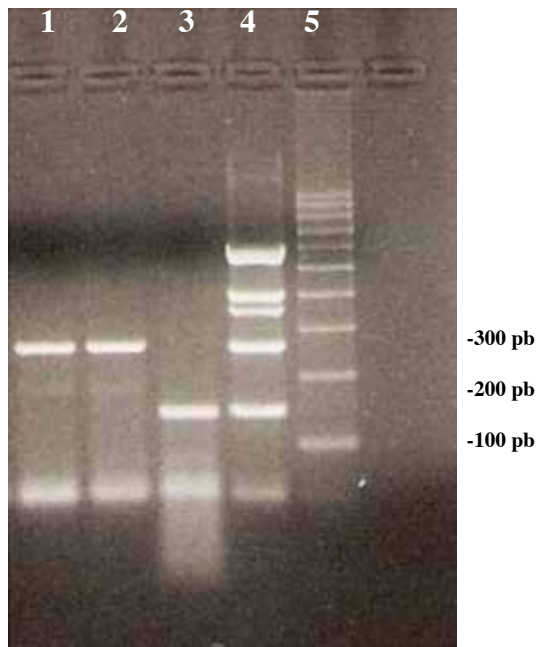


Figura 2. Tipificación de VPH por PCR múltiple 1-2: muestras positivas con la banda de 263 pb correspondiente al tipo 6. 3: muestra con la banda de 144 pb correspondiente al tipo 11. 4: control positivo con las bandas de 144, 263, 360, 413 y 601 pb para los tipos 11, 6, 18, 33 y 16 de VPH, respectivamente. 5: marcador de peso molecular (100 pb, Invitrogen).

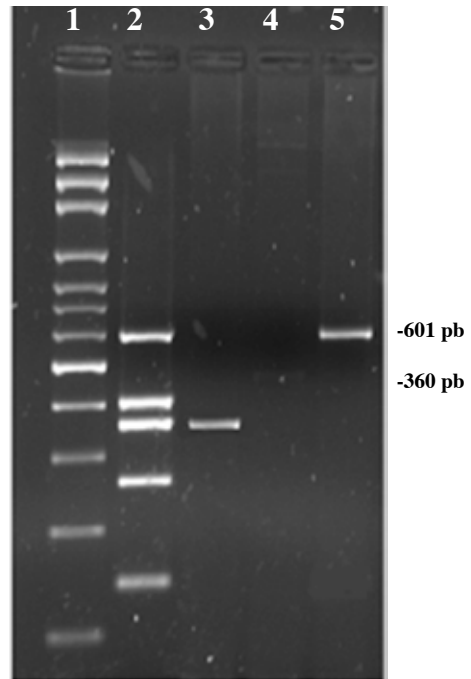


Figura 3. Tipificación de VPH por PCR múltiple. 1: marcador de peso molecular (100 pb, Invitrogen). 2: control positivo. 3: muestra positiva con la banda de 360 pb correspondiente al tipo 18. 5: muestra con la banda de 601 pb correspondiente al tipo 16.

DISCUSIÓN

El proceso de ectropión es considerado como una condición no patológica; sin embargo, está asociado a cambios inmunológicos, hormonales y fisiológicos que pueden favorecer el establecimiento de infecciones por agentes bacterianos o virales que, a su vez, pudieran influir en la generación de una condición patológica (1,3).

Uno de estos agentes es el VPH, considerado como factor de riesgo y agente etiológico del cáncer de cuello uterino, primera causa de muerte oncológica en mujeres de países en desarrollo, siendo los genotipos 16 y 18 responsables de aproximadamente el 70 % de los casos de este cáncer a nivel mundial (8).

Por otra parte, es bien conocido que el epitelio columnar del ectropión cervical es reepitelizado por un epitelio escamoso metaplásico de madurez variable que en los primeros estadios de la metaplasia es vulnerable a estímulos y factores oncogénicos como la infección por VPH, que pueden inducir la aparición de atipias o anomalías, incluyendo displasia y lesiones precancerosas del cuello uterino (3,4).

De allí la importancia de la detección subclínica o latente de VPH, así como de otros microorganismos, que pudieran estar implicados en el desarrollo de lesiones precancerosas o cancerosas en pacientes con diagnóstico de ectropión cervical, lo cual permitiría establecer esquemas de seguimiento más adecuados y seguros para la prevención de malignidad en estas mujeres, dado que poseen mayor riesgo o probabilidad de sufrir una condición patológica. Esta detección se realiza en base a la identificación de secuencias genómicas virales mediante métodos moleculares como hibridación y PCR, considerando que la infección latente o subclínica no presenta síntomas ni está asociada a alteraciones morfológicas, histológicas o inmunológicas.

En este estudio se realizó la detección de VPH en pacientes con ectropión, obteniéndose un 26 % de positividad. Aunque este resultado no es estadísticamente significativo, la presencia latente del virus, indica que debe haber mayor vigilancia médica para las pacientes positivas, con evaluaciones periódicas más estrictas, lo que favorecerá la prevención y permitirá un control más efectivo del riesgo a desarrollar cáncer de cuello uterino, especialmente en los casos donde se detectó VPH tipos 16 y 18 de alto riesgo oncogénico.

Sería recomendable hacer el seguimiento a largo plazo de una muestra representativa de pacientes con ectropión cervical para evaluar la frecuencia de

infección por VPH y la frecuencia de aparición de lesiones precancerosas y cancerosas en comparación con un grupo control, con el fin de estudiar la posible influencia de esta condición no patológica en el desarrollo de cáncer de cérvix. Dicha evaluación pudiera incluir la integración del ADN viral al genoma celular y la determinación de la carga viral.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado por FONACIT, Proyecto G-2005000408, y las muestras en estudio fueron obtenidas en las consultas ginecológicas de la “Maternidad Concepción Palacios». Caracas.

REFERENCIAS

1. Remotti G, De Palo G. Ectopia, ectropión y transformación normal. En: De Palo G, editor. *Colposcopia y patología del tracto genital inferior*. 2ª edición. Barcelona: Editorial Médica Panamericana; 1996.p.64-79.
2. Russell A. “Erosion” of the Uterine Cervix: An Anachronism. *Ast NZ Obstet Gynaecol*. 1991;31(4):358-361.
3. De Palo G, Chanen W, Dexeus S. Cuello uterino. En: De Palo G, Chanen W, Dexeus S, editores. *Patología y tratamiento del tracto genital inferior*. Barcelona: Editorial MASSON; 2000.p.1-31.
4. Reid R. Lesiones del cuello uterino relacionadas con papilomavirus humano: biología y características colposcópicas. En: Krebs H, editor. *Clínicas obstétricas y ginecológicas*. Infección genital por VPH. México DF: Editorial Interamericana; 1989.p.151-171.
5. De Guglielmo Z, Ávila M, Correnti M, Veitía D, Cavazza M. Evaluación, mediante RCP, de la infección por el virus de papiloma humano en muestras de pacientes con diagnóstico clínico o citológico. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 2008;68(4):240-247.
6. Manos M, Ting Y, Wright D, Lewis A, Broker T, Wolinsky S. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*. 1989;7:209-214.
7. Cañadas M, Lloveras B, Lorincz A, Ejarque M, Font R, Bosch F, et al. Evaluación de las técnicas de detección del VPH en los programas de cribado para cáncer de cuello uterino. *Salud Pública Méx*. 2006;48:373-378.
8. OMS. Estadísticas sanitarias mundiales 2009. Disponible on line en: <http://www.who.int/whosis/whostat/2009/es/index.html>