

REPORTE DE CASO

Detección del tipo de papilomavirus humano por el método de PCR-RFLP en un caso con neoplasia intraepitelial de alto grado y captura híbrida II negativa

Detection of human papillomavirus by PCR RFLP assay in a case with negative hybrid capture II result and high grade intraepithelial neoplasia Pap smear result

Mendoza LP^{*}, Kasamatsu E^I, Mann Prado J^{II}, Pereira JS^{II}, Insaurrealde A^I, Rodríguez I^I, Colmán G^I, Paez M^I

^I Departamento de Salud Pública y Epidemiología, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, ^{II} Laboratorio de Virología, Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer de São Paulo, Hospital del Câncer, São Paulo, Brasil

RESUMEN

La infección persistente del virus del papiloma humano (HPV) es un factor necesario para el desarrollo del cáncer de cuello uterino. Este caso reporta una mujer de 43 años, con imágenes citológicas persistentes de neoplasia intraepitelial de grado III (CIN III) y resultados negativos para estudios colposcópicos y anatomopatológicos, como también, para HR-HPV analizado por el método de Captura Híbrida II. Una evaluación histopatológica posteriormente confirmó la existencia de CIN III en mucosa cervical. A fin de detectar otros tipos de HPV no incluidos en la Captura Híbrida II, la muestra fue analizada por el método de PCR-RFLP obteniendo un resultado positivo para HPV 73. En este caso, el uso del método de PCR-RFLP permitió detectar una infección por un tipo específico de HPV, brindando una información útil que puede ayudar en el manejo clínico de mujeres con diagnóstico citológico de CIN III y resultado de Captura Híbrida II negativo.

Palabras claves: HPV 73, CIN III, Captura Híbrida II, PCR-RFLP.

ABSTRACT

Persistent infection with human papillomavirus (HPV) is a necessary factor for the development of cervical carcinoma. We present a 43 year old woman with cytological studies results of cervical intraepithelial neoplasia grade III (CIN III) having negatives results for colposcopy and anatomopathologic studies, as well as for DNA HR-HPV analysed by Hybrid Capture II assay. After that, a histopathological evaluation confirmed the existence of this lesion in cervical mucosa. In order to detect others HPV types not included in the Capture Hybrid II, the sample was analyzed by PCR-RFLP, assay with a positive result for HPV 73. In this case, the use of PCR-RFLP assay allow to detect a type-specific HPV infection, providing a useful information that could help in the clinical management of woman with cytological diagnosis of CIN III and negative Hybrid Capture II results.

Keywords: HPV 73, CIN III, Hybrid Capture II, PCR-RFLP.

INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano (HPV) es el principal agente etiológico del cáncer cervical¹. Aproximadamente 40 tipos de HPV que infectan la mucosa cervical son clasificados como de bajo riesgo HPV (LR-HPV) o de alto riesgo HPV (HR-HPV) basados en asociaciones epidemiológicas conocidas². Los HR-HPV son detectados en más del 95% de los casos de carcinoma cervical³. Por tanto, una identificación del tipo viral podría ser relevante en el manejo clínico de lesiones cervicales y cáncer¹.

Actualmente las pruebas más específicas para la identificación del HPV son el método de hibridación, Captura Híbrida II (CH II, Digene), una prueba disponible comercialmente, capaz de detectar 5 tipos de LR-HPV y 13 tipos de HR-HPV y el método de PCR de un paso con *primers*

**Autor correspondiente: MSc, Laura Mendoza, Dpto. de Salud Pública, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud-Universidad Nacional de Asunción. Dr. Montero y Lagerenza. Asunción – Paraguay. Teléfono: (595) 21 – 422069. Fax: (595) 21 – 480185. Email: lauramt78@yahoo.com.mx*

consensus (MY09 y MY11) que asociado a polimorfismo de fragmentos de DNA obtenidos por enzimas de restricción (RFLP), permite detectar e identificar aproximadamente 40 tipos específicos de HPV^{1,4}.

Este caso describe la utilidad de la identificación del HPV por el método de PCR RFLP ante un resultado negativo de CH II con estudios preliminares citológicos positivos.

PRESENTACIÓN DEL CASO

Mujer de 43 años, procedente de zona urbana, con un nivel educativo universitario, pareja estable, tres hijos, sin antecedentes de enfermedad de transmisión sexual, no fumadora, que presenta resultados citológicos de lesión intraepitelial de alto grado (CIN III) en forma persistente y estudios tanto colposcópicos como histológicos negativos para CIN III, desde Octubre del 2004 hasta Mayo del 2006. La paciente es remitida en Junio del 2006 al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud donde se realiza el análisis de la muestra cervical por el método de CH II (DIGENE CORPORATION), el cual detecta la presencia de DNA de 13 tipos de HR-HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68), obteniendo un resultado negativo. A causa de la imagen persistente de CIN III por citología, la paciente es sometida en Agosto del 2006 a un procedimiento de escisión electro-quirúrgica por lazo (LEEP), detectándose lesión intraepitelial de alto grado CIN III en mucosa cervical, con ocupación de sacos glandulares (Tabla 1). Luego de descartar errores técnicos y de interpretación en el método de CH II, es considerada la posibilidad de la presencia en la muestra cervical de un tipo de HPV no incluido en esta prueba y en el mes de Septiembre la muestra cervical es analizada en el Laboratorio de Virología del Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer de São Paulo, Brasil, por el Método de PCR –RFLP descrito por Bernard *et al.*, 1994, obteniéndose un resultado positivo para el tipo HPV 73⁴.

Tabla 1. Cronología de la evolución del caso según estudios ginecológicos realizados

Fecha	Octubre/2004*		Marzo/2006*	Abril/2006*	Mayo/2006	Junio/2006	Agosto/2006	Setiembre/2006
Estudio	Citología	Anátomo patológico	Citología	Citología	Anátomo patológico	Test DNA HR - HPV – Método Captura Híbrida	Anatomo Patológico	Reacción en cadena de la polimerasa - RFLP
Material	Extendido cérvico – vaginal	Biopsia endocérvi-x-endometrio	Extendido cérvico-vaginal	Extendido cérvico-vaginal	Biopsia endocérvi-x/endometrio	Células descamadas de cuello, vagina	Cuello Uterino- Leep, biopsia endocérvi-x, legrado	Muestra analizada por el método de CH II
Resultado	Imagen citológica de lesión intraepitelial de alto grado CIN III	Mucosa endocervical con infiltrado linfoplasmocitaria mucosa endometrial con cuadro proliferativo irregular en disgregación	Imagen Citológica de lesión intraepitelial de alto grado CIN III	Persiste imagen de una lesión de Alto Grado –CIN III	Mucosa endocervical dentro de límites normales, endometrio progestacional	Ausencia de DNA HPV para los 13 tipos analizados	Lesión intraepitelial de alto grado CIN III en mucosa cervical, con ocupación de sacos glandulares	Presencia de HPV DNA tipo 73

*Estudio colposcópico con resultado negativo

DISCUSIÓN

El cáncer de cuello uterino es el más frecuente en las mujeres de América Latina, y en Paraguay la incidencia es elevada, con una tasa de 41.1 por cada 100.000 habitantes^{5,6}. Considerando esta alta frecuencia es importante utilizar todos los medios disponibles para detectar precozmente una lesión precursora del cáncer cervical y el tipo viral.

En el presente caso se observó una falta de concordancia entre el resultado negativo para HR-HPV por el método de CH II y el positivo para CIN III de los estudios citológicos preliminares. Posteriormente fue detectado HPV 73 en la muestra cervical por el método de PCR-RFLP, el cual demostró ser una herramienta útil para la identificación del tipo viral.

En el Paraguay hasta la fecha fueron detectados tres casos de infecciones mixtas de DNA HPV 73 junto a otros tipos de HPV de alto riesgo oncogénico (16, 45 y 59) de un total 113 casos de cáncer invasivo de cuello uterino analizados, siendo los HPV de alto riesgo los que probablemente desencadenaron la lesión⁷. Estudios anteriores demostraron que el HPV 73 se encuentra asociado con menor frecuencia al cáncer y junto a los tipos 26, 53, 66 y 82 constituyen el 1,1% de los tipos de HPV detectados en casos de cáncer cervical^{8,9}. Se estima que el HPV 73 es detectado en 0,3%

de cáncer cervical⁸. Considerando estos estudios, en este caso, el HPV 73 se presenta como posible agente causal de la lesión en esta paciente.

Aunque el riesgo relativo de HR-HPV es aun desconocido, al parecer estos difieren en su potencial oncogénico^{4, 10}. Considerando que el HPV 73 posee un bajo potencial oncogénico, probablemente una paciente positiva para este tipo viral, presente menor probabilidad de desarrollar un cáncer cervical invasivo. Por lo tanto, la detección del tipo específico es útil para pronosticar su riesgo, contribuyendo al manejo de la paciente.

Como en esta paciente, ante todo caso con estudios citológicos persistentemente positivos y de CH II negativa, se recomienda realizar la identificación del tipo viral por el método de PCR-RFLP complementario, para comprobar la existencia de otro tipo viral y establecer su pronóstico.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Rodas, Director del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Asunción, Paraguay y a la Dra. Luisa Lina Villa, Directora del Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer de São Paulo, Brasil, por su valiosa colaboración con este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. Giovannelli L, Lama A, Capra G, Giordano V, Arico P, Ammatuna P. Detection of human papillomavirus DNA in cervical samples: analysis of the new PGMV-PCR compared to the hybrid capture II and MY-PCR assays and a two-step nested PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2004 Aug; 42(8): 3861-4.
2. Zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Oct 9; 1288(2):F55-78.
3. Wright TC Jr, Schiffman M, Solomon D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, et al. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol.* 2004 Feb; 103(2): 304-9.
4. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis.* 1994; 170:1077-85.
5. Weber W, De Sabata MS, Paredes RM, Rodriguez G, Santos C, Sabillon JU, et al. Cancer in first degree relatives of Latin American women with cervical cancer. A pilot study. *Anticancer Res.* 2005 Mar-Apr; 25(2B):1219-23.
6. IARC. Globocan I. Cancer Incidence and Mortality Worldwide. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 1998. (IARC Cancer Base No.3)
7. Rolon PA, Smith JS, Munoz N, Klug SJ, Herrero R, Bosch X, et al. Human papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay. *Int J Cancer.* 2000 Feb 15; 85(4):486-91.
8. Muñoz N. Valor del test del virus de papiloma humano en el diagnóstico y cribado de la neoplasia cervical. *Med Clin (Barc).* 2003; 121(12):455-6.
9. Schiffman M, Khan MJ, Solomon D, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, et al. A study of the impact of adding HPV types to cervical cancer screening and triage tests. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Jun 15; 97(2):147-50.
10. Villa LL. Biología Molecular: Conceitos e Principios Básicos. In: Martins, N.V., Pereyra, E.A.G. (Ed.) *Conhecendo o HPV Patologia do trato-genital inferior Colposcopia e CAF.* São Paulo: Frontis Editorial; 2000. p. 137-43.