

# Estudio de la prevalencia de los subtipos del virus del papiloma humano mediante el análisis de fragmentos de restricción por la reacción en cadena de la polimerasa

F. Díaz-Flores Estévez<sup>1</sup>, J.A. Saavedra Martínez-Barona<sup>2</sup>, A. Pérez Cejas<sup>1</sup>, C. Hernández Calzadilla<sup>1</sup>

1: Sección de Diagnóstico Molecular. Laboratorio Central.

2: Servicio de Obstetricia y Ginecología

Hospital Universitario de Canarias. Santa Cruz de Tenerife

Recibido: 29-4-99

Aceptado: 4-10-99

## Resumen

*El cáncer de cérvix es la segunda neoplasia más frecuente en la mujer. Hallazgos epidemiológicos y experimentales han conferido al virus del papiloma humano un papel central en la etiología de la neoplasia cervical. Se han asociado más de 20 subtipos diferentes del virus y con el carcinoma cervical, todos ellos con diferente riesgo oncogénico. El subtipo 16 es el más frecuentemente detectado. Mediante el análisis de los fragmentos de restricción de los productos amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa, hemos estudiado un total de 1057 frotis cérvico-vaginales de pacientes, caracterizadas por presentar algún tipo de alteración colposcópica o algún grado de alteración citológica, con el fin de determinar la prevalencia del virus del papiloma humano, tanto por grupo de riesgo como por subtipos, así como estudiar su relación con el tipo de lesión citológica. Así mismo valoramos el grado de recidiva o de curación, tras tratamiento con conización y/o vaporización con láser de CO<sub>2</sub>.*

*Se detectaron secuencias de DNA del virus del papiloma humano en 137 de las pacientes estudiadas (12,9%), caracterizándose el 93,4% de los casos. Encontramos una mayor prevalencia por grupos para el de bajo riesgo, mientras que por subtipo el de mayor frecuencia fue, con una diferencia significativa, el subtipo 16 ( $P < 0,004$ ), seguido del 53 y del 58. Existe una mayor prevalencia de lesiones de bajo grado de malignidad en las pacientes con infección por subtipos de riesgo intermedio y bajo, mientras que en las de alto riesgo, la frecuencia de lesiones tipo neoplasia intraepitelial de alto grado (CINII - CIN III), fue superior. El porcentaje de recurrencias fue del 51,7%, presentándose con mayor frecuencia en los grupos de mayor riesgo oncogénico.*

*Todos los hallazgos realizados corroboran el papel de este virus en la patogenia y en el pronóstico de las lesiones encontradas en pacientes infectadas por el virus. Estimamos que el tipaje del virus del papiloma humano junto con la colposcopia y la citología, es fundamental para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de estas pacientes.*

## Summary

*Cervical cancer is the second most frequent neoplasia in women. Experimental and epidemiological data have conferred human papillomavirus a central role in the ethiology of cervical neoplasia. More than 20 different human papillomavirus subtypes have been associated to cervical carcinoma, and each has been assigned to a different risk group, in terms of oncogenic potential. The aim of this study was to determine virus prevalence, both by risk group and by subtype and to study its relationship with the type of cytological lesion observed. We also evaluated the degree of recurrence and the effectiveness of treatment by conization or laser CO<sub>2</sub> vaporization.*

*Polimerase chain reaction restriction fragment was used to study 1057 cervico-vaginal swabs from patients with abnormal papsmear near and/or colposcopy.*

*We detected human papillomavirus DNA sequences in 12.9% (n=137) of the patients studies, and characterized 93.4% of them. By groups, we found a higher prevalence for the low risk group; by subtype the prevalence was highest for 16 ( $P < 0,004$ ), followed by 53 and 58 subtypes. There is higher prevalence of*

*low-grade lesions at low or intermediate risk subtype infection. In high-risk virus subtypes infected patients, the most frequently lesions were Intraepithelial Neoplasm of high grade (CIN II -C-IN III). The recurrence rate was 51.7%, been higher in the groups with higher oncogenic risk.*

*These findings suggest a role for human papillomavirus in the pathogenesis of cervical cancer and the importance of subtyping to establish a prognosis and suggest that virus typing in adjunct to colposcopy and cytology is important for a correct diagnosis and patient follow up.*

Abreviaturas no estandarizadas:

PCR- Reacción en cadena de la polimerasa

HPV: Virus del papiloma humano

CIN: Neoplasia cervical intraepitelial

hp: Pares de bases

Química Clínica 2000 19 (3)195-8

## Introducción

El cáncer de cérvix es la segunda neoplasia más frecuente en la mujer(1). Los primeros datos epidemiológicos indicaron la existencia de un importante factor de riesgo en un agente oncogénico que posteriormente se identificó como virus del papiloma humano (HPV) (2).

El análisis virológico de la piel y de las lesiones genitales demostraron la pluralidad de este virus y la asociación muy frecuente de determinados tipos de HPV con el cáncer invasivo y la neoplasia cervical intraepitelial (CIN) (3). Existen fundadas evidencias, no sólo epidemiológicas sino también experimentales, que confieren al papillomavirus humano un papel central en la etiología de la neoplasia cervical (4).

La elevada prevalencia de infección por HPV en relación con la baja incidencia de cáncer cervical invasivo y su lesión precursora, la neoplasia cervical intraepitelial, sugieren que la mayoría de las mujeres infectadas por HPV en un momento dado no desarrollarán CIN (estadio III) o cáncer. Si la mayoría de las infecciones por HPV son transitorias y se requiere la persistencia viral para el desarrollo del cáncer, es lógico pensar que la identificación de factores de riesgo relacionados con esta permanencia viral nos ayudará a identificar las mujeres con riesgo elevado de desarrollar neoplasia (4).

Hallazgos experimentales han demostrado que las oncoproteínas virales E6 y E7, expresadas en la mayoría de los carcinomas de cérvix asociados a infección por HPV, constituyen el mayor determinante en la inducción y mantenimiento del fenotipo maligno (5).

Se han asociado más de 20 subtipos diferentes de HPV con el carcinoma cervical, aunque el 16 y 18 son los más frecuentemente detectados.

Se han definido cuatro grupos de HPV con diferente riesgo oncogénico:

-Bajo riesgo: 6/11, 31b, 42, 43, 44, 53, 54, 59, 61, 62, 66, 67 y 69 presentes en CIN de bajo grado y raramente en cáncer invasivo.

-Riesgo intermedio: 31, 33, 35, 36, 39, 51, 52 y 58. más prevalentes en CIN que en cáncer invasivo.

-Alto riesgo/HPV 16, asociado por igual al cáncer invasivo que al CIN.

-Alto riesgo/HPV 18 (18, 45, 46), encontrado más frecuentemente en los cánceres invasivos (6,7).

El pronóstico de una lesión cancerosa de cérvix depende del potencial oncogénico del HPV asociado a ella.

La tríada, citología, tipaje HPV y estudio histológico, junto con el tratamiento de las lesiones precancerosas con láser CO<sub>2</sub> ha mostrado muy buenos resultados en el manejo de las pacientes afectas de dicha patología (8).

En estudios previos determinamos la frecuencia de los subtipos de HPV 6, 11, 16 y 18, en 70 muestras de frotis vaginales de pacientes con algún grado de lesión citológica, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (9). El presente trabajo pretende completar el estudio planteándose una serie de objetivos:

- a) Aumentar el número de pacientes estudiadas.
- b) Analizar mayor número de subtipos de HPV
- c) Establecer el grado y la frecuencia de las lesiones histológicas en los distintos subgrupos de HPV (alto, intermedio y bajo riesgo)

- d) Estudiar el número de recurrencias y el número de curaciones tras tratamiento con láser con CO<sub>2</sub> y/o conización, en las pacientes infectadas por HPV.

## **Material y métodos**

### **Especímenes**

Desde abril de 1997 hemos realizado el estudio del tipaje del virus del papiloma humano a un total de 1057 frotis cérvico-vaginales procedentes de pacientes remitidas desde el módulo de ginecología oncológica del Hospital Universitario de Canarias. Todas las pacientes se caracterizaron por presentar algún grado de alteración citológica, desde simples atipias hasta el mayor grado de neoplasia cervical intraepitelial (CIN III).

### **Protocolo de estudio**

Se realizó el análisis según la descripción del protocolo PVHfast suministrado por el fabricante Pharma Gen (PVHfast, Madrid, España, ref., AK-0393-050-01).

Se determinan en primer lugar los positivos, negativos e inhibidos, mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%, utilizando como marcador de peso molecular el DNA Molecular Weight Marker VIII (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). Se realiza la electroforesis a 10 V/cm.

Si aparece una banda de 450 pares de bases (pb) correspondiente al genoma del HPV y además una banda a 1200 pb correspondiente al control interno, la muestra será positiva. Si sólo aparece una banda a 1200 pb, la muestra será negativa. Si no aparece ninguna banda la reacción de amplificación estará inhibida. En este último caso se purifica el DNA y se vuelve a analizar, sin tomar nueva muestra del paciente, utilizando un equipo de purificación Pharma Gen. Un 10% de las muestras presentan inhibición.

A continuación se procede a la digestión con enzimas de restricción de aquellas muestras que resulten positivas para HPV, por una parte con una de las enzimas únicamente y por otra con la suma de ambas enzimas. Se separan los productos de la reacción mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% utilizando como marcadores de peso molecular los citados anteriormente.

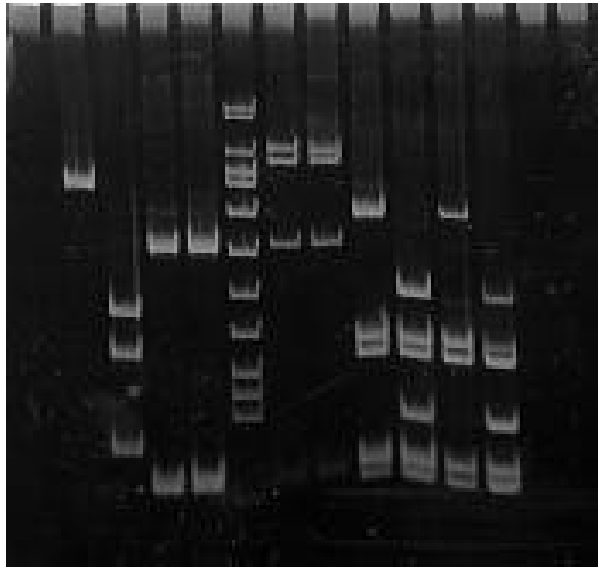
Al incubar el amplificado de una muestra positiva para HPV con ambas enzimas, la banda de 450 pb se digerirá originando un patrón de bandas característico de cada tipo viraj. El tipo se identifica comparando los patrones obtenidos en la electroforesis de las dos digestiones con un esquema que se adjunta en el protocolo. Con este procedimiento la determinación de muestras claramente positivas es relativamente sencilla.

En la determinación del subtipo de HPV presente en las muestras claramente positivas, no existe problema excepto en los subtipos 59/66, 51/40 y 34/44, pues tienen patrones similares formados por fragmentos de tamaño parecido y la identificación del subtipo se hace más laboriosa. Hemos utilizado geles de acrilamida al 8% en vez de los de agarosa recomendados por la casa comercial con el fin de resolver estos problemas. Aunque en las muestras positivas débiles el problema se agrava, dificultando la interpretación durante el subtipaje, en ningún caso supuso un fracaso en la aportación de un resultado correcto. (figura 1)

### **Análisis estadístico**

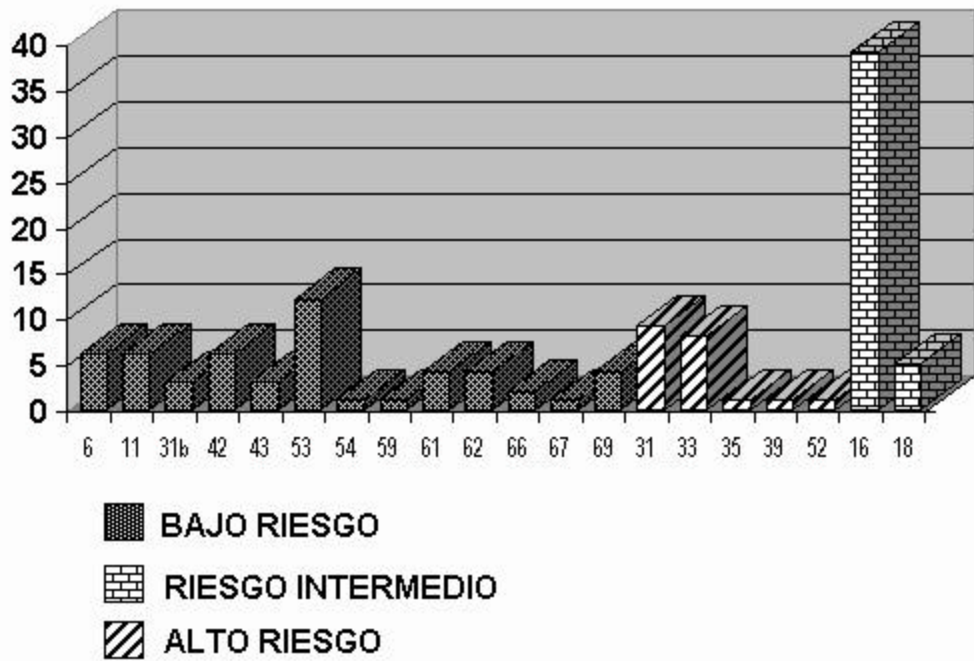
El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante tablas de contingencias, aplicando en cada caso la prueba exacta de Fisher.

Se hizo un seguimiento de las pacientes para detectar las posibles curaciones tras conización y/o láser CO<sub>2</sub>, entendiendo por curación la desaparición total del HPV previamente detectado.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

**Figura 1.** Calles 1 y 2: Subtipo 53. Calles 3 y 4, 6 y 7: Subtipo 16. Calles 8 y 9, 10 y 11 : Coinfección Subtipos 31 y 6 (Se trata de la misma paciente). Calle 5: Estándar de pesos moleculares. Cada pareja de calles representa a una misma paciente. La primera calle es el corte con una enzima y la segunda con ambas enzimas.



**Figura 2.** Prevalencia de infección por virus del papiloma humano en función del grupo de riesgo y de subtipo.

## Resultados

Desde abril de 1997 hasta diciembre de 1998 se analizaron un total de 1057 muestras de frotis cérvico-vaginales procedentes de las consultas externas de Ginecología. Se detectaron secuencias de DNA de HPV en 137 de las pacientes estudiadas (12,9%). Las secuencias encontradas correspondían a HPV caracterizados en 128 de los casos (93,4%) y en 9 casos (6,56%) se detectaron subtipos de HPV no identificados. La prevalencia por grupos fue de 41,4% para los de bajo riesgo (54 pacientes), 24,2% para los de riesgo intermedio (30 pacientes) y 34,3% para los de alto riesgo (44 pacientes). La mayor prevalencia por subtipos (figura 2) fue para el HPV 16 (30,2%), en segundo lugar para el HPV 53 (9,3%) y en tercer lugar para el HPV 58 (8,5%). En 8 casos se produjo coinfección por dos subtipos de HPV.

La relación entre el subtipo de HPV detectado y el grado de lesión histológica presente (tabla 1) demuestra, en general, una mayor frecuencia de lesiones de bajo grado de malignidad (inferiores a CIN 1) en los pacientes con infección de subtipos de riesgo intermedio y bajo. En los infectados con HPV de alto riesgo la frecuencia de lesiones tipo **CIN II-III** fue superior a las CIN I (62,1% frente a 37,8%).

**Tabla I.** Relación entre el subtipo de virus papiloma humano (HPV) detectado y el grado de lesión histológica presente.

Subtipo HPV	< CIN I	CIN II - CIN III
«Bajo riesgo»	28/47	19/47
«Riesgo intermedio»	15/25	10/25
«Alto riesgo»	14/37	23/37

CIN: neoplasia cervical intraepitelial

**Tabla II.** Porcentaje de recurrencias en función del grupo y del subtipo de virus del papiloma humano detectado

Grupo	Subtipo	Recurrencia	Total
Bajo	53	2(13,3%)	
	59	1 (6,66%)	26,6%
	61	1 (6,66%)	
Intermedio	31	3(20%)	
	58	2(13,3%)	40%
	52	1 (6,66%)	
Alto	16	5	33,3%

Se realizó a las pacientes una segunda y en ocasiones una tercera determinación tras tratamiento, en un tiempo variable entre 6 y 12 meses dependiendo en la mayoría de las ocasiones de la paciente y no de lo pautado en la consulta. Se siguieron 29 casos, entre los cuales el número de recurrencias fue de 15 (51,7% del total de casos seguidos). Por subtipos, el porcentaje de recurrencias fue superior (40%), para los de riesgo intermedio (Tabla II).

El número de curaciones tras conización y/o láser CO<sub>2</sub> fue de 14 pacientes (48,27% de las pacientes seguidas). Por grupos, aparecieron 9 casos de curación en el grupo de bajo riesgo (64,2% de las curaciones), 2 en el de riesgo intermedio (14,2%) y 3 en el de alto riesgo (21,4%).

## Discusión

El porcentaje de casos en que detectamos secuencias de DNA de HPV (12,9%) es bajo si tenemos en cuenta varios hechos:

a) Partimos de una población seleccionada en la que imágenes colposcópicas sugestivas o una citología anormal sirven de criterio para introducir a las pacientes en el estudio. Las cifras barajadas por otros autores son muy variadas pero, en la mayor parte de los casos, superiores a las encontradas en nuestro trabajo (11). Es el caso del 82,8% de positividad de Lombart (6), que parten de una población de 297 pacientes afectas de cáncer invasivo de cérvix o de Adams (8), que partiendo de un grupo de mujeres con las mismas características que las de nuestro estudio, obtienen una cifra del 46%. No se trata pues, de una población presuntamente sana y sin seleccionar, en el cual estaría justificada la escasa frecuencia de citologías cérvico-vaginales con infección por HPV. Este es el caso del trabajo de Hildesheim (4) que obtienen un porcentaje del 26% en el estudio de una población 393 mujeres con citologías no patológicas.

b) Que la técnica que empleamos en esta ocasión, es capaz de detectar cualquier tipo de DNA de HPV presente en la muestra, pudiendo tipificarlo en la mayor parte de los casos. Por lo tanto no nos centramos en el estudio de unos cuantos subtipos de HPY como algunos autores consultados. o incluso, como en el caso de nuestros propios trabajos anteriores, lo que sí justificaría el bajo grado de positividad.

La frecuencia por grupos de riesgo es bastante similar. Aunque el que destaca de los tres grupos es el de bajo riesgo, no encontramos diferencia significativa entre ellos.

La frecuencia por subtipos es similar a la de la bibliografía consultada. siendo siempre el más frecuente el HPV 16 (6,12), con una diferencia significativa ( $P < 0,004$ ) con respecto a los HPV 53 y 58 que ocupan el segundo y tercer lugar.

Los subtipos de HPV de intermedio y alto riesgo son los que se han asociado, sobre todo los últimos, con la aparición y progresión de las lesiones genitales hacia cáncer invasivo de cérvix (13,14). Con referencia a este hecho encontramos, una mayor frecuencia de lesiones de alto grado, tipos CIN II y CIN III entre las pacientes infectadas con subtipos de HPV de riesgo elevado (16 y 18). Por el contrario, las pacientes con subtipos de riesgo bajo o intermedio presentan una frecuencia de lesiones de bajo grado superior.

Se detecta un porcentaje de recurrencias tras tratamiento bastante elevado (51,7%), aunque similar a lo detectado por otros autores (4), siendo superior en aquellos grupos con mayor relación con la génesis M cáncer de cerviz, hecho que apoya el dato de su claro papel en la etiología de este tipo de cáncer. Además, el grupo de pacientes con mayor número de curaciones tras tratamiento es aquel que presentó infección por HPV de bajo riesgo. Incluso en este grupo de pacientes, la distribución con relación al diagnóstico citológico es similar a lo comentado, con una mayor frecuencia de lesiones de alto grado (CIN 11-111) entre los subtipos de alto riesgo y una mayor frecuencia de lesiones de bajo grado ( $\leq$  CIN I) entre los de riesgo bajo e intermedio.

## Conclusión

El subtipo de HPV detectado con mayor frecuencia en una población de pacientes con alguna alteración colposcópica o citológica es el 16, con una mayor prevalencia de lesiones citológicas de alto grado. Los otros dos subtipos más frecuentes son el 53 y el 58. Hemos encontrado un mayor número de recurrencias y un menor número de curaciones tras tratamiento entre las pacientes infectadas por HPV de alto riesgo. Todos estos datos parecen corroborar el papel etiológico de los subtipos de HPV de alto riesgo en la génesis del cáncer de cérvix.

La determinación tipo de lesión citológica junto con la detección y el subtipaje de infección por HPV son fundamentales en el manejo de la progresión hacia cáncer de cérvix invasivo. Por ello estimamos que es fundamental, al menos en las pacientes en las que se ha identificado alguna alteración colposcópica y/o citológica, la realización de técnicas encaminadas al diagnóstico y tipificación de una posible infección por HPV coexistente

Correspondencia:

F. Díaz-Flores Estévez

Laboratorio Central. Hospital Universitario de Canarias. Ofra s/n 38320 La Laguna.

Santa Cruz de Tenerife

e-mail: felicitas @cortuf.es

## Bibliografía

1. Parkin D M, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* 1993; 54: 594-606.
2. Rotkin I D. A comparison review of key epidemiological studies in cervical cancer related to current searches for transmissible agents. *Cancer Res* 1973; 33: 1353-67.
3. Dürst M, Gissman L, Ikenberg H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 3812-5.
4. Hildesheim A, Schiffman M, Gravitt P, Glass A, Greer C, Zhang T, et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *Journal of Infectious Diseases* 1994; 169: 235-40.
5. Croock T, Morgenstern J P, Crawford L. Continued expression of HPV -16 E7 protein is required for maintenance of the transformed phenotype of cells co-transfected by HPV- 16 plus EJ-ras. *EMBO J* 1997; 8: 513-9.
6. Lombard I, Salomon A V, Validire P, Zaifram B, De La Rochefordière A, Clough K, et al. Human papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer, *Journal of Clinical Oncology* 1998; 16: 2613-9.
7. Lörincz A T, Reid R, Jenson B. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992; 79: 328-37.
8. Adam E, Kaufman R H, Berkova Z, Icenogle J, Reeves W C. Is human papillomavirus testing an effective triage method for detection of high-grade (grade 2 or 3) cervical intraepithelial neoplasia?. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178: 1235-44.
9. Díaz-Flores Estévez F, Hernández Calzadilla C, Saavedra Martínez-Barona J A, Vera González A M, Detección de los papillomavirus humanos tipos 6b, 11, 16 y 18 en muestras de frotis vaginales mediante reacción en cadena de la polimerasa múltiple. *Quim Clin* 1996; 15: 420-4.
10. Martínez A, Nás R, La Cruz C, Hellín T, Tercero J C, Valverde E et al. Detección y tipado de papillomavirus humano por amplificación genómica en biopsias frotis y orina. *Acta Ginecológica LII* 1995: 51-6.
11. Wheeler C. Human papillomavirus type-specific prevalence, 1996: 112-124.
12. Bosch F X, Manos M, Muñoz N, Sherman M, Jansen A M, Peto J et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *Journal of National Cancer Institute* 1995; 87: 796-802.
13. Konno R, Paez C, Sato S, Yajima A, Fukao A. HPV, Histologic grade and age. Risk factors for the progressions of cervical intraepithelial neoplasia. *J Reprod Med* 1998; 43: 561-6.