

Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas

Adela Carrillo, M en C,⁽¹⁾ Alejandro Mohar, MC, Dr en C,⁽¹⁾ Abelardo Meneses, MC,⁽¹⁾
Mauricio Frías-Mendivil, M en C,⁽¹⁾ Gilberto Solorza, MC,⁽¹⁾ Marcela Lizano, Dra en C. ⁽¹⁾

Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Frías-Mendivil M, Solorza G, Lizano M.
Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas
Salud Publica Mex 2004;46:7-15.

El texto completo en inglés de este artículo está disponible en: <http://www.insp.mx/salud/index.html>

Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Frías-Mendivil M, Solorza G, Lizano M.
Usefulness of combining universal oligonucleotides in detecting human papillomavirus in cervical cancer and premalignant lesions
Salud Publica Mex 2004;46:7-15.

The English version of this paper is available at: <http://www.insp.mx/salud/index.html>

Resumen

Objetivo. Determinar la frecuencia y distribución del virus del papiloma humano en los diferentes estadios que conforman la historia natural del cáncer cérvico uterino, y optimizar la detección mediante el uso de diferentes oligonucleótidos universales. **Material y métodos.** Se trata de un estudio transversal, descriptivo, en el que las muestras fueron colectadas durante enero a diciembre de 1999. El procesamiento de las muestras y el análisis de los datos se realizaron en el Instituto Nacional de Cancerología en la Ciudad de México. Se hizo análisis comparativo con *t* de Student para valores continuos y con *ji* cuadrada para proporciones, y análisis de concordancia entre biopsia y exudado cervical con la prueba estadística de Kappa. Para la detección del virus se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos universales los cuales reconocen diferentes regiones del gen L1 (MY09/11; GP5/6; L1C1/2), y oligonucleótidos específicos para el VPH 16 y el VPH 18, así como secuenciación directa de los productos de la PCR. **Resultados.** Se analizaron 154 muestras: 65 (42.2%) citologías normales, 45 (29.2%) lesiones de alto y bajo grado, y 44 (28.6%) de cáncer invasor. El VPH fue detectado en 95.5% de los casos de cáncer invasor, en 91.6% de lesiones de alto grado, en 66.7% de lesiones de bajo grado y en 23.1% de citologías normales, por la PCR con al menos

Abstract

Objective. To determine the prevalence of human papillomavirus (HPV) infection at different stages of the natural history of cervical cancer. Also, to optimize its detection by means of different sets of general primers. **Material and Methods.** A descriptive, cross-sectional study was conducted between January and December 1999. Samples were processed and analyzed at the Instituto Nacional de Cancerología (National Cancerology Institute) in Mexico City. A comparative analysis was performed using Student's *t* for continuous values and the chi-squared test for proportions. A contingency analysis was made between biopsy and cervical exudates with the Kappa statistic. HPV detection was done by PCR with general primers which recognize different regions of the L1 gene (MY09/11; GP5/6; L1C1/2) and with HPV16- and HPV18- specific primers, as well as direct sequencing of PCR products. **Results.** In total, 154 samples were analyzed: 65 (42.2%) of them showed normal cytology; 45 (29.2%) high and low grade lesions; and 44 (28.6%) invasive cervical cancer. HPV was detected in 95.5% of invasive cervical cancers, in 91.6% of high grade lesions, in 66.7% of low grade lesions, and in 23.1% of normal smears, by PCR with at least one set of oligonucleotide primers. HPV detection was more efficient in biopsy specimens than in cervical scrapes. The total percentage of HPV detection us-

(1) Instituto Nacional de Cancerología, México, DF, México.

uno de los juegos de oligonucleótidos utilizados. La detección fue más eficiente en las muestras obtenidas por biopsia que en los exudados cervicovaginales. El porcentaje total de detección del VPH con un juego de oligonucleótidos universales (37.6%) aumentó sustancialmente (60.4%) al combinarlo con otros dos juegos de oligonucleótidos universales. **Conclusiones.** La presencia del VPH de alto riesgo es elevada inclusive en mujeres con epitelios cervicales con diagnóstico citológico normal. La detección del VPH mejora al utilizar distintos juegos de oligonucleótidos universales que reconocen la región L1 del VPH. Con una adecuada toma de muestra, el análisis para detección de ADN en exudado cérvico-vaginal es una buena alternativa de diagnóstico del VPH. El texto completo en inglés de este artículo está disponible en: <http://www.insp.mx/salud/index.html>

Palabras clave: VPH; cáncer cérvico uterino; PCR; oligonucleótidos; México

ing only one set of universal oligonucleotides (37.6%) increased to 60.4% when the other two sets of universal oligonucleotides were used. **Conclusions.** The frequency of high risk HPV is high even in women with reported normal cytology. HPV detection improves when different sets of general primers directed to the L1 region are used. HPV DNA screening in cervical scrapes may be a good alternative HPV diagnostic tool when the samples are appropriately taken. The English version of this paper is available at: <http://www.insp.mx/salud/index.html>

Key words: HVP; cervical cancer; PCR; primers; Mexico

El cáncer invasor del cuello del útero (CaCu) es un problema de salud pública en países subdesarrollados. Se estima que cada año se diagnostican 500 000 casos nuevos en el mundo. Es responsable de 190 000 muertes anuales, de las cuales 78% ocurren en los países en desarrollo, donde es la causa principal de muerte por cáncer en mujeres.¹ Durante los últimos años, la incidencia y mortalidad por cáncer de cérvix en los Estados Unidos de América (EUA) y otros países desarrollados han disminuido notablemente.^{1,2} Sin embargo, en los países en desarrollo, esta patología no ha presentado una disminución importante. Son los países latinoamericanos los que informan las tasas de incidencia más altas.¹ Dentro de éstos, México ocupa el primer lugar de mortalidad por esta enfermedad.³⁻⁵

Los estudios sobre la epidemiología del CaCu han demostrado que esta entidad se comporta como una enfermedad de transmisión sexual, y diversos factores de riesgo parecen estar involucrados en su desarrollo.⁶ Los de mayor asociación son inicio temprano de relaciones sexuales, número de parejas sexuales, infecciones virales y bacterianas, hábitos reproductivos, uso de anticonceptivos orales, hábitos dietéticos y tabaquismo, entre otros.⁷ Sin embargo, múltiples estudios epidemiológicos han concluido que el factor definitivo en la etiología del CaCu es la infección del cérvix por algunos tipos del virus del papiloma humano (VPH).^{6,8}

El VPH es un grupo de virus que infecta epitelios y mucosas del ser humano y se clasifica en tipos de acuerdo con homologías en su material genético. En la actualidad, se reconocen más de 100 tipos diferentes.⁹ Un estudio mundial informó la presencia de material genético (ADN) de este virus en más de 95% de casos de CaCu.¹⁰ Posteriormente, mediante técnicas de biología

molecular más sensibles, la detección se ha optimizado, hasta obtener 99.7% de positividad al VPH en los tumores analizados.¹¹ Los tipos del VPH que se encontraron con mayor frecuencia fueron el 16, 18, 31, 33 y 35. El tipo 16 es el responsable de aproximadamente 50% de las infecciones en CaCu, mientras que el VPH 18 alcanza 18 a 20%.^{10,11}

En el Instituto Nacional de Cancerología de México (INCan) se han realizado trabajos previos con las técnicas de Dot y Southern Blot en pacientes con lesiones precancerosas y con CaCu. En éstas se ha encontrado una prevalencia para el VPH de 39 y 34.3%, de acuerdo con la técnica empleada.^{12,13} Esta prevalencia probablemente fue subestimada, en parte porque sólo se utilizaron sondas para los tipos virales 6, 11, 16 y 18.

Se reconoce que un método de detección más sensible que el Southern Blot es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), para detectar secuencias de ADN virales y celulares.¹⁴⁻¹⁶ En otro estudio,¹⁷ se utilizaron las técnicas de PCR e hibridación con Dot Blot para analizar la infección por el VPH en un grupo de pacientes que acudieron para atención médica al INCan. En ese trabajo se encontró una prevalencia para el VPH de 87% en CaCu, 83.3% para lesiones de alto grado, 33.3% para lesiones de bajo grado y 17% en mujeres sin evidencia de infección por citología.

Estudios de prevalencia del VPH en la mucosa cervical publicados recientemente han demostrado que ésta depende no sólo del tipo de población estudiada y de la técnica de diagnóstico utilizada en su detección, sino también del tipo de muestreo que se realice sobre la lesión cervical.^{18,19} Se ha observado que entre muestras obtenidas de biopsia y exudado cervical las prevalencias difieren hasta en 50% en favor de las biopsias.⁸

El objetivo de este trabajo fue analizar la frecuencia y distribución del VPH en muestras obtenidas de biopsia y exudado cervicovaginal en tres grupos de mujeres que acudieron para atención médica al INCan y a otros hospitales y centros de salud. En este estudio se incluyeron pacientes con CaCu, pacientes con lesiones premalignas y mujeres con lesiones inflamatorias benignas del cérvix.

Material y métodos

Este es un estudio transversal descriptivo, donde se incluyeron mujeres mexicanas que asistieron para realizarse el examen de Papanicolaou a una de las siguientes unidades hospitalarias de la Ciudad de México: Instituto Nacional de Cancerología, Hospital General de México, Centro de Salud "Castro Villagrana" del Instituto Mexicano del Seguro Social y la Clínica Mexfam "La Villa", de enero a diciembre de 1999, sin antecedentes de terapia antineoplásica o inmunomoduladora, sin neoplasias previas en otra localización del cuerpo, y que accedieran voluntariamente a participar en el estudio mediante firma de carta de consentimiento informado.

Las participantes se sometieron a un examen ginecológico de rutina; se tomaron muestras de exudado cervicovaginal, con espátula de Ayre, tanto para su tinción por la técnica de Papanicolaou como para la extracción del ADN y análisis del VPH.

Para fines del estudio a todas las mujeres incluidas se les tomó muestra para el Papanicolaou dirigido por colposcopia. Después de la toma del exudado cervical se les aplicó ácido acético a 5% para revelar lesiones macroscópicas. Sólo ante la evidencia de alguna lesión macroscópica se procedió a la toma de la biopsia. Cuando el médico no observó cambio sugestivo de malignidad no se tomó biopsia. El resultado citohistológico de éstas reclasificó a las muestras en casos sanos y/o con lesión premaligna y maligna.

El diagnóstico citológico e histológico de todas las muestras incluidas en el estudio fueron interpretados por un solo citólogo y un solo patólogo del INCan, siguiendo el criterio de la FIGO (Federation International of Gynecology and Obstetrics).²⁰

Se estudió un total de 154 muestras cuya distribución fue la siguiente: 44 casos de CaCu, 21 casos de lesión intraepitelial escamosa de bajo grado, 24 casos de lesión intraepitelial escamosa de alto grado y 65 casos con citologías normales

Extracción y purificación del ADN

Tanto las muestras de exudado cervicovaginal como las biopsias se resuspendieron en 1 ml de Buffer de Lisis

(Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 0.1M pH 8, SDS 0.5%, Proteinasa K 200 µg/ml, RNAsa 20 µg/ml), se incubaron a 37 °C y 55 °C, respectivamente, toda la noche.²¹

La extracción del ADN en ambos tipos de muestras se realizó con fenol-cloroformo, y la precipitación con etanol, según la técnica descrita en Sambrook.²¹

Detección y tipificación del VPH

Las 154 muestras de ADN fueron sometidas a diagnóstico de VPH. Estas muestras fueron positivas a la previa amplificación del gen de β-globina por PCR que amplifica un fragmento de aproximadamente 268 pb a una Tm de 55 °C, como lo describen Resnick y colaboradores.²² Para la detección del VPH se utilizaron tres diferentes juegos de oligonucleótidos universales: (MY09/MY11, GP5/GP6 y L1C1/L1C2) que amplifican fragmentos de diferente tamaño de la región L1 del VPH.²²⁻²⁵ Cada reacción se llevó a cabo en un termociclador modelo 480 (Perkin Elmer), en un total de 40 ciclos, un primer ciclo de desnaturalización a 94 °C por 10 min y un ciclo final de extensión a 72 °C por 7 min; los 38 ciclos intermedios se llevaron a cabo a una Tm de 55 °C para los oligonucleótidos MY09/11 y de 48 °C, tanto para GP5/6, como para L1C1/2. El resultado se visualizó por medio de electroforesis en gel de agarosa, identificando la banda amplificada del tamaño esperado.

Amplificación de la región L1 del papilomavirus

- Todas las muestras se amplificaron con los oligonucleótidos universales MY09/MY11, localizados dentro de la región L1 del genoma del VPH, lo que dio un fragmento aproximado de 450 pb.²²
- Todas las muestras que resultaron negativas a la amplificación con MY09/MY11 fueron sometidas a amplificación con oligonucleótidos universales (GP5/GP6), localizados dentro de la secuencia reconocida por los oligonucleótidos MY09/MY11 y que amplifican un fragmento de 150 pb.^{23,24}
- Las muestras que siguieron negativas se analizaron con otro par de oligonucleótidos universales L1C1/L1C2 que generan un fragmento de 240-250 pb de la región L1.²⁵

Determinación del tipo del VPH

Se procedió a la tipificación de las muestras que resultaron positivas para el VPH por cualquiera de los juegos de oligonucleótidos utilizados para la región L1. Para tal caso se eligieron oligonucleótidos específicos

para la región E6/E7 de VPH16 bajo las condiciones descritas por Berumen y colaboradores,²⁶ que amplifican un fragmento de 792 pb a una Tm 57 °C.

De la misma manera, se utilizaron los oligonucleótidos que, a una Tm de 57 °C, amplifican un fragmento de 360 pb de la región larga de control (LCR) de VPH 18, descritos por Ong y colaboradores.²⁷

Secuenciación del ADN

Finalmente, para determinar el tipo del VPH en todas aquellas muestras que no fueron VPH 16 ni VPH 18, se realizó la técnica de secuenciación directa de los productos de la PCR mediante el kit de Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing (Amersham Pharmacia Biotech) y marcaje con fósforo 33 (Amersham Pharmacia Biotech).²⁸ Se realizó electroforesis en gel de acrilamida 8%, urea 7M, a 1 800 volts. Para determinar el tipo viral, la secuencia obtenida se incorporó a un banco de datos (BLAST) para su comparación con las secuencias del ADN existentes del VPH.

Análisis estadístico

Se analizó la distribución del tipo viral en las diferentes etapas del cáncer cervical. El análisis comparativo se realizó mediante la prueba *t* student para valores continuos, y la prueba de Ji cuadrada para proporciones.²⁹

Para el análisis de concordancia entre la detección del VPH en biopsia y exudado cervical se utilizó la prueba estadística de *Kappa*.³⁰

Resultados

En este estudio se analizaron 154 muestras que fueron positivas al gen de β -globina. De acuerdo con el examen histocitológico la distribución de los diagnósticos fue la siguiente: 44 (28.6%) casos de CaCu, 45 (29.2%) casos de lesión intraepitelial escamosa de bajo y alto grado, y 65 (42.2%) casos con citologías normales.

En el cuadro I se presenta la distribución de la edad de acuerdo con el diagnóstico histológico en estas 154 mujeres, así como la prevalencia del VPH conforme al resultado de la PCR con cualquiera de los tres juegos de oligonucleótidos aplicados. Se observó que las pacientes con CaCu invasor eran de mayor edad, en comparación con las de los otros grupos ($p < 0.05$).

En el primer análisis se encontró que 58 de los 154 casos (37.6%) fueron positivos a la amplificación con los oligonucleótidos MY09/11. Las muestras positivas se distribuyeron en los diferentes estadios clínicos de la siguiente manera: 6/65 citologías normales (9.2%); 6/21

lesiones de bajo grado (28%); 18/24 lesiones de alto grado (75%) y 28/44 de CaCu (63%).

Posteriormente, las 96 muestras negativas a MY09/11 fueron amplificadas con los oligonucleótidos GP5/GP6, lo que dio un total de 30 muestras positivas adicionales. Después, las 66 muestras que persistieron negativas se sometieron a amplificación con los oligonucleótidos L1C1/L1C2, con lo que se obtuvieron cinco nuevas muestras positivas, logrando que la detección del VPH se aumentara sustancialmente. En total, en 93 de las 154 muestras analizadas (60.4%) se detectó ADN de algún tipo de VPH y las 61 muestras restantes resultaron negativas a esta infección.

Con este análisis las 93 de 154 muestras que resultaron positivas al VPH se agruparon de la siguiente manera: 15/65 citologías normales, y 14/21 lesiones de bajo grado; 22/24 lesiones de alto grado 42/44 CaCu. Los porcentajes de esta distribución se muestran en la figura 1 en los cuatro grupos de muestras estudiadas, y se observa una clara tendencia a mayor positividad al VPH según avanza el grado de lesión de la enfermedad. El grupo de cáncer invasor presenta 95.5% de positividad, el grupo de mujeres con lesión de alto grado 91.6%, en los casos de lesiones de bajo grado se encontró 66.7% de positividad; mientras que en el grupo de mujeres con estudio citológico normal fue de 23.1%. Estas diferencias fueron altamente significativas ($p = 0.0001$).

Con el fin de evaluar la eficiencia de cada uno de los pares de oligonucleótidos utilizados se seleccionaron 49 muestras de las que, independientemente del tipo de lesión, se contaba con al menos 2 μ g de ADN para efectuar el análisis y que previamente hubieran resultado positivas al VPH en el análisis anterior, por cualquier par de los oligonucleótidos utilizados. Las muestras que reunieron dichos criterios se sometieron a amplificaciones independientes con los tres juegos de oligonucleótidos. De los resultados obtenidos en estas condiciones

Cuadro I
EDAD PROMEDIO Y POSITIVIDAD AL VPH DE LAS MUJERES
ESTRATIFICADA POR EL TIPO DE LESIÓN.
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA.
MÉXICO, DF, 1999

Diagnóstico	n	VPH+ %	Media años	Intervalo
Citología normal	65	23.1	37.8	18-72
Lesión de bajo grado	21	66.7	37.5	22-57
Lesión de alto grado	24	91.6	41.9	19-77
Cáncer invasor	44	95.5	47.1	26-74

se observó un total de muestras positivas al VPH de 41/49 (83.6%), para L1C1/L1C2; 30/49 (61.2%), para GP5/GP6 y 14/49 (28.5%), para MY09/11. Valga mencionar que si bien sólo seis de las 49 muestras fueron positivas para los tres pares de oligonucleótidos, al intersectar los resultados con los diferentes pares, ocho muestras resultaron positivas, tanto a GP5/6 como a MY09/11, nueve coincidieron con MY09/11 y L1C1/2 y, finalmente, 25 fueron positivas tanto para GP5/6 como para L1C1/2.

En el cuadro II se presenta la distribución de los tipos virales encontrados mediante el uso de oligonucleótidos específicos para los tipos 16 y 18, así como la secuenciación directa de los productos de amplificación. Entre los VPH de alto riesgo, según la reciente clasificación de Muñoz y colaboradores³¹ se detectaron los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59 y 66, de los cuales el tipo 16 fue el que se encontró con mayor frecuencia (46.2%), seguido del VPH 18 (16%). En cuanto a los tipos virales de bajo riesgo fueron detectados el 6A, 11, 44, 54, 61 sólo en mujeres sanas y lesiones de bajo grado (NIC I). Por último, en cinco muestras positivas al VPH (*no determinados*) no se obtuvo el tipo específico, debido a que el material fue insuficiente para la secuenciación. Al clasificar por riesgo oncogénico los tipos del VPH encontrados se observó que los pacientes con lesiones de alto grado y CaCu registraron porcentajes de positividad al VPH de alto riesgo

de 87.5% y 90.9%. Mientras que el grupo de mujeres con citología normal o lesión de bajo grado registraron frecuencias de infecciones de alto riesgo de 21.5 y 38%, respectivamente.

En la figura 2 se presenta la distribución de los tipos VPH 16 y VPH 18 de acuerdo con el diagnóstico. Observamos la mayor positividad para estos tipos virales en las lesiones de alto grado y CaCu invasor (62.5 y 68.2%, respectivamente).

La detección del VPH de acuerdo con el tipo de muestra obtenida se puede observar en el cuadro III. Los datos provienen de 91 pacientes de quienes se contaba con muestras de biopsia y de exudado cervicovaginal.

En 55 casos (60.4%), donde predominaron lesiones de alto grado y CaCu invasor, tanto en la biopsia como en el exudado cervicovaginal se pudo detectar la presencia de ADN viral. En 22 casos (24.1%), en donde la biopsia y el exudado cervicovaginal fueron negativos al VPH, predominaron muestras con reporte normal y lesiones premalignas (15/22). Los casos discordantes, que fueron 13 (14.3%), correspondieron a tres muestras con citología normal, dos con lesiones de bajo grado y ocho con lesiones de alto grado. Un solo caso fue positivo en el exudado cervicovaginal y no en la biopsia.

El valor de *Kappa*, es decir, el grado de concordancia entre biopsia y exudado cervicovaginal, fue calculado en un total de 91 casos (IC 95% 55.45%-75.05%), y resultó ser de 65.25%. Con estos hallazgos se obtuvo una sensibilidad de 81% y una especificidad de 96% para el exudado cervicovaginal, tomando como referencia a la biopsia.

Discusión

En México el CaCu representa un grave problema de salud pública, tanto por su morbilidad como por la alta mortalidad en mujeres jóvenes^{5,32} y los trabajos publicados sobre la prevalencia del VPH en CaCu en el país han informado diferentes frecuencias de positividad, según la técnica empleada en la detección.^{12,13,17,33,34} Algunos de estos estudios se limitaron básicamente a la detección de los tipos virales 16 y 18.^{26,33,34} Sin embargo, hay poca información en muestras de lesiones precursoras de CaCu y en mujeres con citología normal.^{35,36} Lazcano y colaboradores³⁶ describen en población mexicana una prevalencia de 16.7% del VPH en mujeres menores de 25 años de edad; ésta disminuye a 3.7% en las mujeres de 25 a 44 años y vuelve a aumentar hasta 23% en mayores de 65 años de edad. En dicho estudio se observa que los tipos de VPH de alto riesgo son los más frecuentes

Los resultados del presente trabajo ofrecen una visión de la frecuencia y tipos del VPH en una pobla-

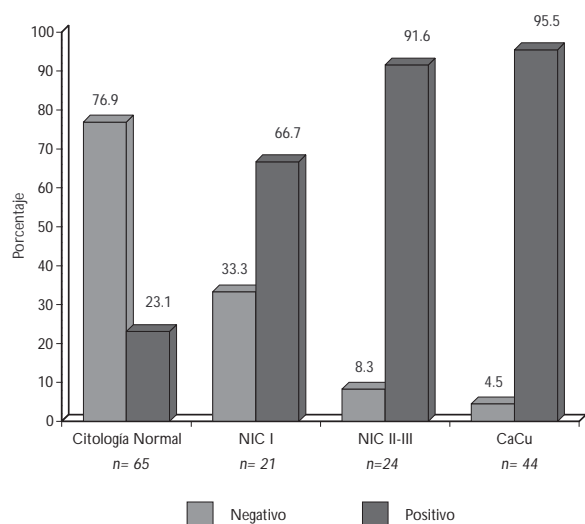


FIGURA 1. DISTRIBUCIÓN DEL PORCENTAJE DE VPH ENCONTRADO EN LOS 154 CASOS ESTUDIADOS, AGRUPADOS DE ACUERDO CON EL GRADO DE LESIÓN PRESENTADO AL MOMENTO DE LA REVISIÓN. INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA. MÉXICO, DF, 1999

Cuadro II
DISTRIBUCIÓN DE LOS TIPOS DEL VPH DETECTADOS. INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA.
MÉXICO, DF, 1999

Estadio clínico	n	Tipos de VPH																		ND*
		Alto riesgo									Bajo riesgo									
		16	18	31	33	35	39	45	51	52	58	59	66	6	11	44	54	61		
Sano	65	15	50	3	5		1		5						1					
NIC I	21	14	7	4	1		1		2					1		1	1	1	2	
NIC II-III	24	22	2	14	1	1	2		1	1									1	
CaCu	44	42	2	22	8	2			3	1	1	1	1	1					2	
Total	154	93	61	43	15	3	2	2	1	3	9	1	2	1	1	1	1	1	5	

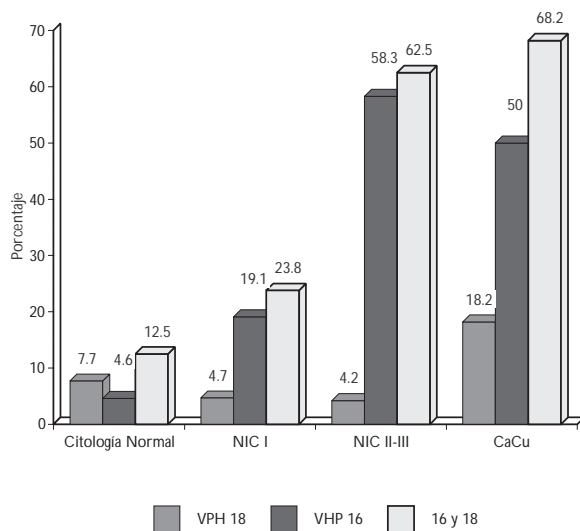


FIGURA 2. DISTRIBUCIÓN DEL PORCENTAJE DE VPH 16 Y VHP 18 DE ACUERDO CON EL TIPO DE LESIÓN. INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA. MÉXICO, DF, 1999

Cuadro III
POSITIVIDAD AL VPH ENTRE BIOPSIA Y RASPADO
CERVICOVAGINAL. INSTITUTO NACIONAL DE
CANCEROLOGÍA. MÉXICO, DF, 1999

Raspado	Positivo		Biopsia Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
Positivo	55	60.4	1	1.1	56	61.5
Negativo	13	14.3	22	24.2	35	38.5
Total	68	74.7	23	25.3	91	

Nota: La concordancia de resultados obtenida entre biopsia y raspado cervicovaginal, después de aplicar el estadístico Kappa fue de 65.25% (IC 95%, intervalo 55.45% 75.05%)

ción mexicana que incluye pacientes con diagnóstico de CaCu invasor, lesiones premalignas de alto grado y bajo grado y mujeres con citología normal, utilizando el sistema de reacción en cadena de la polimerasa con diferentes juegos de oligonucleótidos universales y específicos para detectar VPH. Los resultados son similares a los obtenidos en México y otras poblaciones con alta incidencia de CaCu.^{11,36}

Mediante la técnica de la PCR se puede detectar un gran número de genotipos del VPH que infectan la zona anogenital.^{11,37} Sin embargo, ahora se conoce que existen más de 100 tipos del VPH, de los cuales más de 70 pueden infectar dicha región anatómica. Es difícil establecer métodos para la detección de cada uno de ellos; por lo tanto, algunas regiones específicas del VPH son utilizadas para construir oligonucleótidos consenso o universales, capaces de amplificar varios tipos diferentes del VPH. Algunos autores han diseñado diferentes oligonucleótidos universales complementarios a la región L1 de VPH,^{22-25,38} para la región E6/E7.²²

Con el propósito de aumentar la capacidad de detección del VPH, en las muestras previamente negativas con los oligonucleótidos MY09/11 se decidió emplear otros dos juegos de oligonucleótidos universales que amplificaran diferentes fragmentos de la región L1 de VPH (GP5/GP6; L1C1/L1C2). Encontramos que el uso de más de un juego de oligonucleótidos universales amplía el margen de detección para este virus.^{24,39}

En la amplificación realizada a 49 muestras positivas al virus con los tres juegos de oligonucleótidos se pudo observar una mejor detección del VPH con L1C1/2 (41/49) y GP5/6 (30/49), en comparación con MY09/11 (14/49). Si bien no es claro el hecho de por qué sólo seis de las 49 muestras pudieron amplificarse con los tres pares, se observa de igual manera que 25 de las mismas se detectaron con GP5/6 y L1C1/2, lo que refuerza la idea de una mejor sensibilidad para

estos últimos dos pares. Dado que los oligonucleótidos MY09/11 han mostrado ser muy útiles en otros estudios,³¹ no descartamos que la baja eficiencia que obtuvimos con ellos se deba a problemas técnicos. Nuestros resultados muestran que de ser este el caso, los oligonucleótidos LC1/2 y GP5/6 pudieran ser más eficientes que MY09/11 en la amplificación de un material que no se encuentre en el estado de pureza idóneo. Por otra parte, se sabe que en un ADN fragmentado se amplifican mejor fragmentos pequeños que grandes. MY09/MY11 amplifica fragmentos de 450 pb, mientras que L1C1/L1C2 amplifica 250 pb y GP5/GP6 150 pb, lo que los haría más eficientes en estas condiciones.

Con estos hallazgos sugerimos que el uso de los tres pares de oligonucleótidos universales aumentará indiscutiblemente la detección del ADN del VPH en diferentes muestras de cérvix. Sin embargo, en ocasiones se debe decidir entre el uso de un par de oligonucleótidos que nos garanticen una óptima detección sin aumentar el costo o el esfuerzo, por lo que en nuestra experiencia se recomendaría iniciar el análisis con los oligonucleótidos L1C1/2.

En México la información sobre la prevalencia de la infección cervical por el VPH en población general es escasa. Estudios recientes muestran una alta prevalencia en mujeres menores de 35 años de edad y sexualmente activas.³⁶ La prevalencia del VPH en nuestro estudio fue de 60.4% en todas las muestras analizadas, con una clara tendencia a mayor positividad en lesiones de alto grado y en CaCu. En mujeres con citología normal y lesiones de bajo grado la frecuencia de infección por el VPH fue de 21.5 y de 38%, respectivamente, para VPH de alto riesgo, lo que es comparable con otros estudios.^{36,40-43} Esto confirma la alta frecuencia de portadoras asintomáticas.

En nuestro estudio encontramos un porcentaje alto de VPH (95.5%) en muestras de CaCu, en donde el VPH 16 predominó en 50% de los tumores analizados. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos de muestras de CaCu procedentes de diversos países, donde la prevalencia del VPH fue de 99.7%.^{10,11}

En este estudio observamos que en las lesiones de alto grado (NIC II-III) la presencia del VPH fue similar a la obtenida en el grupo de mujeres con CaCu. Con esto vemos que esta prevalencia es mayor conforme progresa la enfermedad, lo que apoya la participación de este virus en el desarrollo del CaCu.

Trabajos previos reportan que más de 70% de las lesiones de alto grado son positivas para el VPH, y que resulta necesario una persistencia de la infección con VPH de alto riesgo para la progresión hacia NIC III y cáncer invasor.⁴⁴⁻⁴⁶ La infección por el VPH es frecuente en mujeres jóvenes y sexualmente activas. Sin em-

bargo, los factores de riesgo precisos para el desarrollo de la infección, la respuesta inmunológica a la misma, su incidencia y duración en cada una de las etapas de la neoplasia cervical no están bien definidos. Algunos estudios informan que el pronóstico de las pacientes con CaCu depende del potencial oncogénico del tipo viral con el cual están infectadas.^{31,45,47,48} De igual modo, la carga viral también ha sido considerada un factor pronóstico; sin embargo, los resultados son contradictorios sin poder definir adecuadamente el verdadero valor de este posible factor pronóstico.⁴⁹

Para la óptima detección del VPH el tipo de muestreo es clave, ya sea mediante biopsias o exudados cervicovaginales. Al comparar estas dos formas de muestreo en las mismas pacientes observamos una positividad de 74.7% en biopsia, en contraste con 61.5% de aquellas muestras obtenidas por exudado cervicovaginal. La diferencia en los datos reportados posiblemente se deba a que la cantidad de células obtenidas con la toma del exudado cervicovaginal no fue representativa de la zona de transformación y del endocérnix. También se debe considerar la posibilidad de la existencia de menor cantidad de ADN viral en la mucosa cervical, la presencia de inhibidores de la PCR o simplemente muestreo inapropiado, como se ha informado.^{50,51} Consideramos que la sensibilidad puede mejorar si se utilizan técnicas de muestreo más eficaces. Esto es, mediante el uso de herramientas más adecuadas que garanticen la toma de material representativo, tanto del endocérnix como del exocérnix. Por ejemplo, en el método de captura híbrida (Digene) se ha mejorado la toma de la muestra al utilizar un cepillo especial que permite una toma eficiente de células endocervicales y exocervicales y que se introduce en un *buffer* que las preserva adecuadamente.⁵² En relación con la concordancia observada, la reproducibilidad del resultado entre biopsias y exudado cervical fue satisfactoria, con un valor de *Kappa* de 65.25%.

Aunque los resultados con los métodos anteriores sean satisfactorios, en la actualidad la utilidad de dichas pruebas en sus formas comerciales se ve limitada por su elevado costo relativo. La detección específica del VPH de alto riesgo es de suma importancia en el seguimiento de la paciente con infección persistente para determinar una posible progresión o regresión de la lesión cervical. Por otra parte, el conocer la distribución no sólo de tipos sino de variantes virales en lesiones premalignas, permitirá definir variantes de alto riesgo para el desarrollo de CaCu.⁵³

La muerte por cáncer cervicouterino puede prevenirse con el tamizaje citológico, que puede detectar lesiones pre-neoplásicas y subclínicas. De este modo, la disminución en la mortalidad observada en varios

países se ha atribuido en gran parte a la introducción de programas organizados de tamizaje.

Actualmente, el conocimiento de los tipos del VPH asociados con CaCu ha permitido establecer medidas de prevención primaria para esta neoplasia. También se hacen esfuerzos para desarrollar algún tipo de vacuna que proteja al huésped de la infección por el VPH, evite la re-infección o induzca la regresión de lesiones ya establecidas, como el cáncer invasor.⁵⁴⁻⁵⁷ Nuevas estrategias para el control del cáncer de cérvix serán aconsejables cuando se cuente con métodos terapéuticos y vacunas preventivas que demuestren su efectividad contra los tipos carcinogénicos del VPH. De este modo resulta importante evaluar la distribución de los distintos tipos y variantes virales, con el fin de lograr métodos de control eficientes dirigidos a poblaciones específicas.

Agradecimientos

Agradecemos la valiosa ayuda para el desarrollo de este trabajo de las siguientes personas: Dra Martha Torroella y a la química Margarita Ibarra (INCan, México, DF); MC Armando Valle Gay y MC Laura Godínez (Hospital General, México, DF); MC Ma Eloísa Dickinson (Centro de Salud Castro Villagrana, Tlalpan, Ciudad de México); MC Rubén Ramírez y MC Hermelinda Varela (Clínica Mexfam, La Villa, México, DF) y M en C Alberro Rojas Ochoa (IIBM, UNAM, México, DF).

Referencias

- Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999;83:18-29.
- Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the worldwide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer* 2002;97:72-81.
- Kuri MP, Méndez VR, De la Garza-Salazar J, Mohar BA, Angeles AA, Chávez ML *et al*, comp. Compendio del registro histopatológico de neoplasias en México. México, DF. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud 1997:41-47.
- Mohar A, Frias M, SÚchil L, Macías-Martínez C, Tapia-Conyer R. Epidemiología del cáncer cervicouterino en México. *Ann Oncol* 1998;7:S222-S226.
- Mohar A, Frias M. Epidemiology of cervical cancer. *Cancer Invest* 2000;18:584-590.
- Muñoz N, Bosch X, De Sanjosé S, Tafur I, Izarzugaza I, Gili M *et al*. Risk factor for cervical intraepithelial neoplasia grade III/ carcinoma *in situ* in Spain and Colombia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993;2:423-431.
- Reeves WC, Brinton LA, García M, Brenes NN, Herrero R, Gaitán E *et al*. Human papillomavirus infection and cervical cancer in Latin America. *N Engl J Med* 1989;320:1437-1441.
- Muñoz N, Bosch FX, De Sanjosé S, Tafur I, Izarzugaza I, Gili M *et al*. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: A population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 1992;52:743-749.
- Zur Hausen H. Papillomavirus causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:690-698.
- Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J *et al*. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796-802.
- Walboomers J, Jacobs M, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-19.
- Ordóñez R, Mendoza L, Reynoso R, Solorza G, Ramírez-Gaytán JL, Meneses A *et al*. Papilomavirus humano en pacientes con cáncer cervicouterino en el Instituto Nacional de Cancerología. *Rev Inst Nal Cancerol* 1993;39:1809-1813.
- Mendoza-Alcantar L, Lara-Ortiz M, Reynoso-Pablos R, Ramírez-Gaytán JL. Detección del papilomavirus humano en ADN de tejido normal y lesiones premalignas del cérvix por hibridación molecular. *Rev Inst Nal Cancerol* 1994;40:8-13.
- Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro C, Chimera J *et al*. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 1991;265:472-477.
- Schiffman M. Validation of VPH hybridization assays: Correlation of filter *in situ*, Dot blot and PCR with Southern blot. En: Muñoz N, Bosh FX, Shah KV, Meheus A, Ed. *The Epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus*. Lyon: IARC Scientific Publication, 1992;119:169-179.
- Guerrero E, Daniel RW, Bosch FX, Castellsagué X, Muñoz N, Gili M *et al*. Comparison of Virapap, southern hybridization and polymerase chain reaction methods for human papillomavirus identification in a epidemiological investigation of cervical cancer. *J Clin Microbiol* 1992;30:2951-2959.
- Torroella M, Morsberger S, Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Ibarra M *et al*. HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecol Oncol* 1998;70:115-120.
- Lazcano-Ponce E, Moss S, Alonso de Ruiz P, Salmerón CJ, Hernández AM. Cervical cancer screening in developing countries: Why is it ineffective? The case of Mexico. *Arch Med Res* 1999;30:240-250.
- Flores Y, Shah K, Lazcano E, Hernández M, Bishai D, Ferris DG *et al*. Design and methods of the evaluation of an HPV-based cervical cancer screening strategy in Mexico: The Morelos HPV study. *Salud Publica Mex* 2002;44:335-344.
- International Federation of Gynecology and Obstetrics. Staging announcement: FIGO staging of gynecologic cancers: Cervical and vulva. *Int J Gynecol Cancer* 1995;5:319.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2a. edición. Nueva York (NY): Cold Spring Harbor, 1989;vol.2:9-16.
- Resnick R, Cornelissen M, Wright D, Eichnigen GH, Fox HS, Schegget J *et al*. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:1477-1484.
- Van den Brule A, Meijer CJL, Bakels V, Kenemans P, Walboomers JM. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer mediated and type specific polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990;28:2739-2743.
- Snijders P, Van den Brule A, Schrijnemaker H, Snow G, Meijer Ch, Walboomers JM. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol* 1990;71:173-181.
- Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, Mizuno M, Yoshikura H, Iwamoto A. Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cancer Res* 1991;82:524-531.
- Berumen J, Casas L, Segura E, Amescua JL, García-Carrancá A. Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int J Cancer* 1994;56:640-645.

27. Ong CK, Chan SY, Campo MS, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V *et al.* Evolution of human papillomavirus type 18: An ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol* 1993;63:6424-6431.
28. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-5467.
29. Zar J. *Biostatistical analysis*. 2a. edición. Londres:Prentice-Hall, 1984:40-49.
30. Kelsey J, Thompson D, Evans A. *Methods in observational epidemiology*. Oxford: Oxford University Press, 1986:285-308.
31. Muñoz N, Bosch X, De San José S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-527.
32. Mohar A, Frias M, Suchil L, Mora-Macías T, De la Garza J. Epidemiología descriptiva de cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología de México. *Salud Publica Mex* 1997;39: 253-258.
33. González-Garay M, Barrera-Saldaña H, Avilés L, Alvarez-Salas L, Gariglio P. Prevalence in two Mexican cities of human papillomavirus DNA sequences in cervical cancer. *Rev Invest Clin* 1992;44:491-499.
34. Hernández-Avila M, Lazcano-Ponce E, Berumen J, Cruz-Valdés A, Alonso de Ruiz P, González-Lira G *et al.* Human papillomavirus 16-18 infection and cervical cancer in Mexico: A case-control study. *Arch Med Res* 1997;28:265-271.
35. Zamora PA, Terrés SA. Infección por virus del papiloma humano en mujeres y hombres mexicanos identificación por el sistema de captura de híbridos. *Rev Mex Patol Clin* 1998;45:9-16.
36. Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah K, Alonso P *et al.* Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer* 2001;91:412-420.
37. Sarkar FH, Crissman JD. Detection of human papillomavirus DNA sequences by polymerase chain reaction. *BioTechniques* 1990;9:180-185.
38. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989;7:209-214.
39. Husnjak K, Grce M, Magdic L, Pavelic K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Meth* 2000;88:125-134.
40. Kiviat N, Koutsky L, Paavonen J, Galloway D, Critchlow C, Beckmann A *et al.* Prevalence of genital papillomavirus infection among women attending a college student health clinic or a sexually transmitted disease clinic. *J Infect Dis* 1989;159:293-302.
41. Melkert P, Hopman E, Van den Brule A, Risse E, Van Diest P, Bleker O *et al.* Prevalence of HPV in cyto-morphologically normal cervical smears, as determined by the polymerase chain reaction, is age-dependent. *Int J Cancer* 1993;53:919-923.
42. Hildesheim A, Schiffman M, Gravitt P, Glass AG, Greer CE, Zhang T *et al.* Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* 1994;169:235-240.
43. Berumen J, Miranda E, Zafra G, Casas L, Segura E, Ordóñez R. Epidemiología molecular de cánceres de alta incidencia en México. *Gac Med Mex* 1997;133:35-41.
44. Schiffman M, Bauer H, Hoover R, Glass AG, Cadell DM, Rush BB *et al.* Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:958-964.
45. Remmink A, Walboomers J, Helmerhorst TJM, Voorhorst FJ, Rozendaal I, Risse E *et al.* The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: Natural history up to 36 months. *Int J Cancer* 1995;61:306-311.
46. Nobbenhuis M, Walboomers J, Helmerhorst T, Rozendaal L, Remmink J, Risse E *et al.* Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: A prospective study. *Lancet* 1999;354:20-25.
47. Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman M, Hutchinson M, Morales J *et al.* Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:464-474.
48. Ho G, Bierman R, Beardsley L, Chang Ch, Burk R. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338:423-428.
49. Lörincz AT, Castle PE, Sherman ME, Scott DR, Glass AG, Wacholder S *et al.* Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet* 2002;360:228-229.
50. Muñoz N, Bosch FX, De Sanjosé S, Viladiu P, Tormo J, Moreo P *et al.* El virus del papiloma humano en la etiología del cáncer cervicouterino. *Bol Oficina Sanit Panam* 1993;115:301-308.
51. Eluf-Neto J, Booth M, Muñoz N, Bosch FX, Meijer C, Walboomers J. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Br J Cancer* 1994;69:114-119.
52. Peyton CL, Schiffman M, Lörincz A, Hunt WC, Mielzynska I, Bratti C *et al.* Comparison of PCR and Hybrid capture-based human papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. *J Clin Microbiol* 1998;36:3248-3254.
53. Lizano M, Berumen J, Guido MC, Casas L, García-Carrancá A. Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1227-1231.
54. Wheeler Cosette. Preventive vaccines for cervical cancer. *Salud Publica Mex* 1997;39:283-287.
55. Berumen J, Villegas N. Vacunas terapéuticas recombinantes contra el cáncer del cuello uterino. *Salud Publica Mex* 1997;39:288-297.
56. Gariglio P, Benítez-Bribiesca L, Berumen J, Alcocer JM, Tamez R, Madrid V. Therapeutic uterine-cervix cancer vaccines in humans. *Arch Med Res* 1998;29:279-284.
57. Cornelison T. Human papillomavirus genotype 16 vaccines for cervical cancer prophylaxis and treatment. *Curr Opin Oncol* 2000;12:466-473.