

Detección Inmunohistoquímica de Papilomavirus Humano en Neoplasias Cervicales

DELIA JARA¹, EDUARDO RENGIFO², VIOLETA SEMINARIO¹, MARIA-FE MALASPINA³,
AUGUSTO YAMADA⁴ y JOHN VITORIO¹

¹Instituto de Patología - Facultad de Medicina, UNMSM. ²Hospital Nacional Arzobispo Loayza.

³Centro de Salud Max Arias Scheriber - Ministerio de Salud. ⁴Centro Médico Naval.

RESUMEN

OBJETIVOS: Comparar la sensibilidad del método inmunohistoquímico para detección de PVH, con la del método citológico, colposcopia y evaluación histológica, en lesiones preneoplásicas y cáncer invasor del cuello uterino. **MATERIAL Y MÉTODOS:** Se realizó biopsias cervicales bajo evaluación colposcópica a 91 pacientes de centros médicos de Lima, quienes tenían resultados anormales en un estudio citológico previo. Se obtuvo además información, directamente y de sus historias clínicas. Se registró los resultados del examen citológico, colposcópico, histopatológico de la biopsia y la detección inmunohistoquímica de los antígenos del PVH. **RESULTADOS:** Se reportó diagnóstico de PVH por citología en 39/91 (43%), por colposcopia en 57/91 (63%) y por histología en 78/91 (86%). Hubo expresión inmunohistoquímica de antígenos de PVH en 53/91 (56%), la mayor detección fue de lesiones escamosas intraepiteliares (LEI) de alto grado que LEI de bajo grado. **CONCLUSIONES:** La prevalencia de PVH en cáncer cervical y precursores es alta, y la inmunohistoquímica no se recomienda como método de tamizaje para detectar PVH, debido a su baja especificidad y sensibilidad.

Palabras claves: Virus del Papiloma; Neoplasias del Cuello Uterino; Inmunohistoquímica; Condiloma Acuminado.

IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN CERVICAL CANCER

SUMMARY

OBJECTIVES: To establish the prevalence of Human Papillomavirus (HPV) in pre-malignant lesions and invasive cervical lesions, and to assess the sensitivity and specificity of immunohistochemical method to detect HPV antigens with respect to the cytologic, colposcopic and anatomopathologic studies. **MATERIAL AND METHODS:** Cervical biopsy samples were taken under colposcopy among 91 women from Lima, who had a previous abnormal cytologic control. Results of their cytologic, colposcopic and biopsy samples, as well as immunohistochemical detection of viral antigens were recorded. **RESULTS:** HPV was diagnosed 39/91 (43%) by cytologic, 57/91 (63%) by colposcopic, and 78/91 (86%) by histologic methods. HPV antigen expression positivity was 53/91 (56%) by immunohistochemistry. High grade intraepitheliary scamous lesions (ISL) were more frequent than low grade ISL. **CONCLUSIONS:** Prevalence of HPV among cervical cancer and ISL was high. We considered that immunohistochemical method is not appropriated to HPV infection screenings due to its low sensitivity and specificity.

Key words: Papillomaviruses; Cervix Neoplasms; Immunohistochemistry; Condylomata Acuminata.

Correspondencia:

Dra. Delia Jara Facundo
Instituto de Patología
Facultad de Medicina, UNMSM,
Jr. Zorrillos N° 408 - Breña, Lima 5, Perú
E-mail: bibloayza@sanfer.unmsm.edu.pe

INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino constituye en nuestro país la neoplasia maligna de mayor morbimortalidad en mujeres mayores de 15 años sexualmente activas, con una alta incidencia y prevalencia a nivel nacional (¹⁻³). En la etiología del cáncer cervical se señala múltiples factores, uno de ellos es la infección por Papilomavirus Humano (PVH), agente responsable del desarrollo de enfermedades benignas y malignas de las mucosas vaginal, cervical y otras (⁴⁻⁹). El PVH infecta las células de la capa basal del epitelio y la replicación viral sucede en células basales proliferantes, pero las proteínas del cápside estructural viral (función de genes tempranos) no son detectadas morfológicamente; luego, por encima de la capa parabasal proliferante, las células empiezan a madurar y el citoplasma se hace más abundante y eosinofílico, indicando síntesis de queratina (expresión de genes tardíos), la cual se manifiesta por la producción de proteínas estructurales virales (^{10,11}).

Varios subtipos de PVH están relacionados con el proceso de carcinogénesis; se describen más de 60 subtipos (genotipos), los cuales varían en su habilidad epiteliotrópica y se dividen en grupos de bajo riesgo (subtipos 6, 11), riesgo intermedio (subtipos 31, 33, 35, 51) y alto riesgo (subtipos 16 y 18), estos últimos observados en las lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado y en el carcinoma cervical infiltrante. El genoma del virus en el cáncer cervical invasivo está comúnmente dentro del ADN del huésped. Las proteínas E6 y E7 producidas por subtipos de PVH de alto riesgo, son críticas para la transformación maligna por su habilidad para unirse e inactivar al gen p53 y la proteína Rb (supresores tumorales del huésped), los cuales normalmente inhiben las mitosis; sólo una minoría de cánceres cervicales inducidos por PVH son inactivados por mutación (¹²). La utilidad de la detección de antígenos de PVH por inmunohistoquímica sigue siendo algo controversial, ya que la mayoría de los patólogos piensa que la detección de PVH por inmunohistoquímica es específica pero relativamente de baja sensibilidad y que la identificación viral, así como de sus subtipos, es muy importante para determinar el riesgo potencial de progresión a cáncer cervical. Algunos especialistas peruanos han realizado investigaciones de detección de PVH por este método (¹³), pero no se ha llegado a conclusiones definitivas, por lo que es el objetivo de este estudio investigar la sensibilidad del método de inmunohistoquímica para detectar

antígenos de PVH y su prevalencia en lesiones preneoplásicas y cáncer invasor del cuello uterino en comparación con lo hallado usando los medios histológico, citológico y colposcópico.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio es de tipo prospectivo, observacional y descriptivo, llevado a cabo en el Instituto de Patología de la Facultad de Medicina de la UNMSM, y el Hospital Arzobispo Loayza, donde se evaluó biopsias cervicales de 91 pacientes con citología e histología anormal, obtenidas bajo evaluación colposcópica. Los datos de historia clínica fueron obtenidos directamente en formatos previamente elaborados y también de las historias clínicas de las pacientes.

Citología. Fue informada de acuerdo al Sistema Bethesda: Lesiones escamosas intraepiteliales de Bajo grado (LEI BG); Lesiones Escamosas intraepiteliales de Alto grado (LEI AG), Carcinoma escamoso invasor y células escamosas atípicas de etiología no definida (ASCUS, siglas del inglés: "Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance"). Independientemente se detectó alteraciones morfológicas de las células epiteliales en relación con infección por PVH, caracterizadas por binucleación, hiperpicnosis e hipertrofia nuclear, coilocitosis, disqueratosis, y anfofilia citoplasmática.

Exámen colposcópico. Se hizo en el Servicio de Ginecología del Hospital Nacional Arzobispo Loayza, y fue informado de acuerdo a lo descrito en la literatura (cervicitis, epitelio blanco, punteado, mosaico, vasos atípicos, condiloma y patrones mixtos). Colposcópicamente, las lesiones subclínicas dadas por PVH se observan como placas de epitelio blanco y plano y en otros de acuerdo a las alteraciones tisulares dadas por el virus y el grado de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) o carcinoma evolutivo existente.

Histología. Las biopsias fueron fijadas en formol neutro, por 4 a 24 horas, luego incluidas en parafina, y teñidas por H-E. El informe se realizó de acuerdo al Sistema Bethesda y Richart (^{14,15}). El condiloma acuminado asociado a infección por PVH se diagnosticó (independientemente de la clasificación anterior) de acuerdo a los criterios de Meissels (⁹): acantosis, papilomatosis, hiperqueratosis y paraqueratosis del epitelio escamoso, con atipia coilocitócica de grado

menor en el estrato inferior y con queratinocitos globulosos, núcleos grandes y de contornos irregulares, o binucleación, muy basófilos o de color negruzco, con vacuolización perinuclear prominente "coilocitosis" de células del estrato superior del epitelio.

Inmunohistoquímica. Se detectó antígenos de PVH por inmunohistoquímica usando el método streptavidín-biotín: Se efectuó cortes histológicos de 5 µm, los cuales fueron luego desparafinizados en xilol y rehidratados a través de alcoholes, agua destilada y PBS. Se hizo un pretratamiento con tripsina, y la recuperación antigénica se hizo usando un horno microondas (Goldstar-MH1256). Se siguió los siguientes pasos: bloqueo de los tejidos con peróxido de hidrógeno por 5 min y lavado con buffer citrato; coloración inmunohistoquímica a temperatura ambiente; incubación con el anticuerpo primario específico 30 min (Ac monoclonal rabbit para PVH prediluido, DAKO LSAB); incubación con anticuerpo secundario (LINK) Ig antimouse biotinizado por 30 min y lavado con buffer citrato; incubación con streptavidín por 30 min., lavado con buffer citrato en 2 baños por 5 min, reacción con substrato cromógeno Diaminobenzidine (3-amino-9-ethylcarzol) hasta que aparezca la reacción de color, luego contraste del espécimen con Hematoxilina de Harris y montaje con medio especial (DAKO). Para la lectura inmunohistoquímica se evaluó la tinción con cruces: negativo (0), débil o dudoso (+), moderado (++) e intenso (+++). Se consideró positivo a partir de 2 cruces

en células que tenían expresión en el núcleo, citoplasma y/o membrana, las que fueron observadas en epitelios morfológicamente bien definidos y queratinizados, en condilomas, LEI BG, LEI AG y carcinoma epidermoide invasor. Para asegurar la especificidad y sensibilidad de los Ac primarios, se utilizó secciones de tejido de condiloma vaginal con fuerte expresión de Ag de PVH y como control negativo se usó suero normal de conejo como anticuerpo primario en tejido cervical normal.

Análisis estadístico. Los resultados de las evaluaciones citológicas, colposcópicas, histológicas e inmunohistoquímica de las lesiones cervicales asociadas a PVH se mostraron mediante tablas, promedios y porcentajes, de acuerdo a la estadística descriptiva.

RESULTADOS

La edad promedio de las mujeres estudiadas fue 34.4 años, con un rango de 19 a 57 años.

Evaluación citológica: 97% de las muestras tuvieron reacción inflamatoria aguda y crónica (grados moderado a severo), asociada con mayor frecuencia a infección bacteriana. Los hallazgos citológicos reportados de acuerdo al sistema de Bethesda, se consignan en la Tabla N° 1. De los 16 casos informados como ASCUS en el estudio citológico, doce correspondieron

Tabla N° 1.- Diagnóstico citológico de sección de cuello uterino de acuerdo al sistema Bethesda.

Citología	n	%
LEI Bajo Grado	40	43.9
Condiloma (14)		
NIC I (26)		
LEI Alto Grado	31	34.1
NIC II (18)		
NIC III (13)		
Ca. Escamoso Invasor	4	4.4
ASCUS (16)	16	17.6
Total	91	100.0

Tabla N° 2.- Expresión inmunohistoquímica de Antígenos de PVH.

Histología	Inmunohistoquímica	
	n	PVH (+) %
LEI Bajo Grado	42	24 57
Condiloma	20	11 55
NIC I	22	13 59
LEI Alto Grado	43	26 60
NIC II	22	13 59
NIC III	21	13 62
Ca. Escamoso Invasor	06	03 50
Total	91	53 58

por histología a LEI de bajo y alto grado, y uno a carcinoma invasor.

Se detectó alteraciones morfológicas compatibles con infección por PVH (Figura N° 1) en 39 de los 91 casos evaluados (42,9%).

Diagnóstico histológico y colposcópico: Los resultados del estudio histológico reportados según el sistema Bethesda & Richart fueron: LEI BG en 42 pacientes (46,2%); LEI AG en 43 pacientes (47,2%) y Ca. EI en 6 pacientes (6,6%) (Tabla N° 2).

El estudio colposcópico mostró patrones anormales en 9/91 (9,9%), punteado blanco en 14/91 (15,4%), epitelio blanco en 20/91 (22,0%), mosaico en 11/91 (12,1%), vasos atípicos en 3/91 (3,3%), y formas mixtas en 34/91 (37,4%).

Se observó imágenes sugestivas de condiloma por colposcopia en 57/91 (62,6%) y por diagnóstico histológico en 78/91 (85,7%). Al comparar los métodos morfológicos para el diagnóstico de PVH, observamos: (a) Citología 39/91 (42,9%); (b) Colposcopia 57/91 (62,6%) y (c) Histología 78/91 (85,7%).

Inmunohistoquímica: La positividad de expresión viral, determinada por la presencia de pigmento pardo rojizo finamente granular, tuvo las siguientes formas de presentación: a) Intranuclear: dentro de coilocitos de células infectadas (Figura N° 2); b) Intracitoplasmática: alrededor

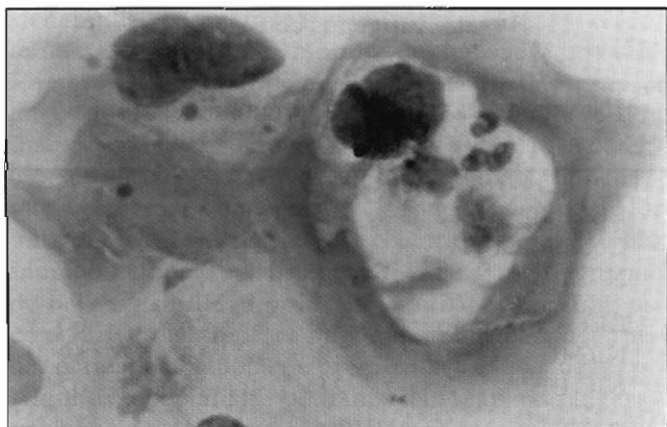


Fig. N° 1.- Célula epitelial escamosa infectada por PVH con hipertrofia y picnosis nuclear, binucleación y coilocitosis perinuclear amplia. Método PAP (400X).

del coilocito (Figura N° 3); c) Membrana de células epiteliales alterada morfológicamente por PVH. La Tabla N° 2 muestra los casos positivos de infección por PVH en 53 de 91 casos (58,2%): LEI BG fue 24/42 (57,1%), LEI AG 26/43 (60,5%), Ca escamoso 3/6 (50,0%) (Figura N° 4). En 7/16 (43,8%) casos con histología negativa a PVH, se identificó antígeno viral en áreas de epitelio superficial disqueratósico y paraqueratósico, como tinciones granulares rojizas, delimitando núcleos, citoplasma o membranas (Figura N° 5).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados indican que la infección por PVH en este grupo de pacientes tiene una elevada prevalencia, observando que los métodos de diagnóstico morfológico (histológico y colposcópico), son altamente sensibles para diagnosticar enfermedad subclínica por PVH asociada o no a cáncer cervical y lesiones preclínicas, mientras que el método inmunohistoquímico se observó como el de menor precisión para detectar PVH, con resultados semejantes a los del estudio citológico, que fue el de más baja precisión dentro de los métodos morfológicos, lo que está de acuerdo con lo señalado por otros investigadores^(6,8,9). La presencia según histología de LEI de bajo y alto grado, y de un caso de carcinoma invasor, nos sugiere recomendar que toda lesión catalogada como ASCUS en la citología debe tener un seguimiento mediante estudio

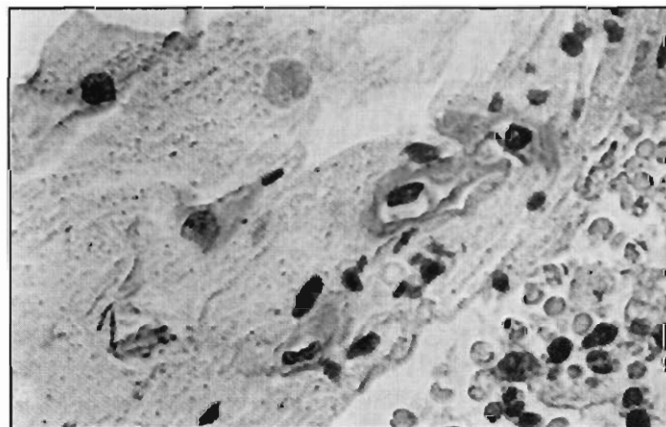


Fig. N° 2.- Expresión nuclear de antígenos de PVH, con coilocitos perinucleares bien definidos en epitelio escamoso cervical. Método streptavidín (250X).

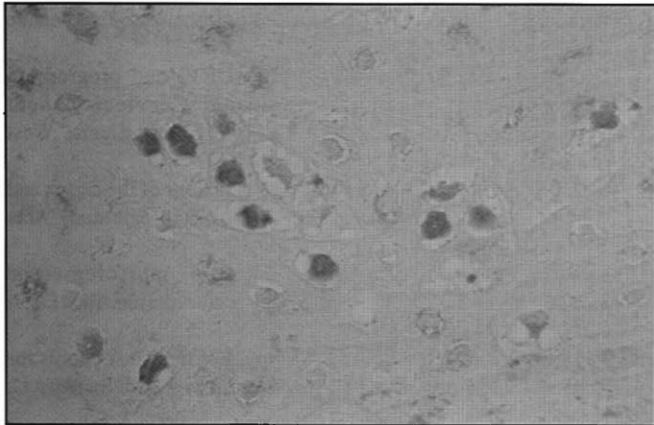


Fig. N° 3.- Expresión de antígenos de PVH en el citoplasma de la célula epitelial escamosa. Método streptavidín (250 X).

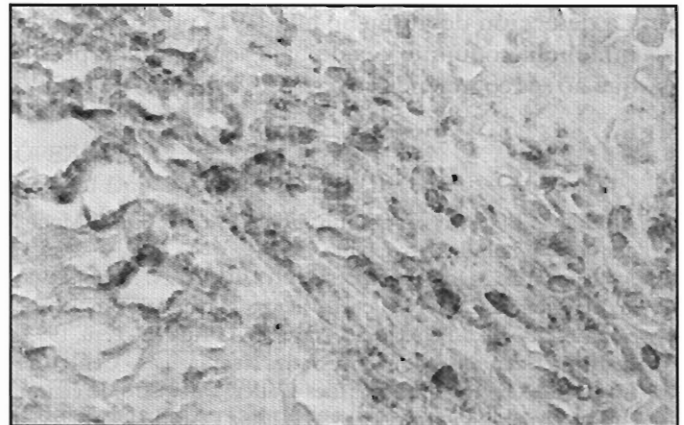


Fig. N° 4.- Expresión de PVH en núcleo de células de carcinoma escamoso. Método streptavidín (250X).

colposcópico e histológico para así determinar el diagnóstico definitivo.

Los antígenos de PVH han sido detectados en nuestro medio en 1989 por Castro De La Mata y col., según refiere Santos C (13), quien halló 30% de positividad en lesiones de tipo preinvasoras e invasora; Zevallos en 1992 (13), estudió las secreciones del pene de esposos de mujeres con cáncer cervical en comparación con un grupo control y halló diferencias significativas de expresión de PVH (34,5% y 19,4%). En Ecuador, López (10) en 1992 reportó una sensibilidad de la técnica de 55% y especificidad de 82%, con un valor predictivo positivo de 86%.

La expresión total de antígenos de PVH por inmunohistoquímica en nuestro estudio fue 58,2%, de ella correspondió 42 de 53 (79,2%) a NIC y carcinoma, y las lesiones de NIC en forma gradual tuvieron la más alta tinción positiva, lo cual demuestra su alta relación con el proceso de carcinogénesis cervical.

En 7 casos se encontró infección por PVH en forma oculta, con positividad en el núcleo, por lo cual este método podría ser útil para detectar algunas lesiones de PVH no halladas por métodos morfológicos, por lo que tampoco recomendamos el uso de la inmunohistoquímica como método de rutina, o para efectuar tamizajes de PVH, debido a que en varios casos se observó una baja sensibilidad y especificidad para diagnosticar antígenos virales de PVH, aún en condilomas morfológicamente bien definidos, a la vez que este método no permite de-

teccionar los subtipos de PVH con mayor riesgo para desarrollar carcinogénesis, por lo que el uso de la biología molecular (PCR) es el método recomendado para identificar este virus y sus genotipos.

CONCLUSIONES

1. La prevalencia de PVH en cáncer cervical y lesiones precursoras es alta.
2. La histología y la colposcopia son métodos de alta sensibilidad en el diagnóstico de infección por PVH.

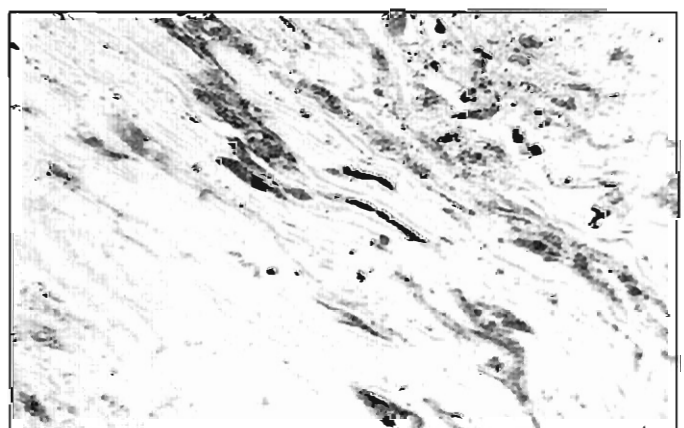


Fig. N° 5.- Infección oculta de PVH en epitelio escamoso superficial queratinizado. Método streptavidín (250X).

3. La detección de antígenos de PVH por método de inmunohistoquímica es de baja sensibilidad, por lo que no se recomienda su uso como método de rutina.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) **Albújar P.** El cáncer en Trujillo, 1984 –1987 REGCAT Monografía N° 1-Trujillo. Noviembre 1992.
- 2) **Asociación de Médicos Ex-Residentes del INEN.** Magnitud de la detección de Cáncer del cuello uterino y mamario a nivel nacional. XII Jornada Peruana de Cancerología. Huaraz - Perú, 1993.
- 3) **Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas - Centro de Investigación en Cáncer "Maes-Heller".** Registro de cáncer en Lima Metropolitana. 1990-1991. Lima - Abril 1995.
- 4) **Brescia RJ, Jenson AB, Lancaster WD, Kurman RJ.** The role of human papillomaviruses in the pathogenesis and histologic classification of precancerous lesions of the cervix. *Hum Pathol* 1986; 17(6): 552-9.
- 5) **Cannistra SA, Niloff JM.** Cancer of the uterine cervix. *N Engl J Med* 1996; 334(16): 1030-8.
- 6) **Galdós R.** Aspectos colposcópicos de la infección "Papiloma Virus Humano" en el tracto genital femenino. *Acta Cancerológica* 1993; 23(3): 19-24.
- 7) **Gusberg MD, Runowicz C.** Gynecologic cancers. *Text Female Genital Cancer.* 1988.Cap. 33.
- 8) **Haran D.** Human Papillomavirus (HPV) and progression of cervical displasia *International Cervical Cancer Symposium.* November 26 - 30, 1991, Saint Lucia, West Indies, p 31, 1991.
- 9) **Meissels A, Fortin R.** Condylomatous lesions of the cervix and vagina: II cytologic colposcopic and histopathologic study. *Acta Cytol*, 21:379, 1977.
- 10) **López Alarcón G.** HPV: Estudio morfológico e inmunohistoquímico en biopsias del cuello uterino. *Rev Ecuat Gin Obst.* 1993; 2(2).
- 11) **Taylor Y.** Core Immunomicroscopy. En: *Diagnostic tools for surgical Pathology.* 2nd edition. Londres: E. W. Sanders C; 1994.
- 12) **Street D, Delgado G.** The role of p53 and HPV in cervical cancer [Editorial]. *Gynecol Oncol* 1995; 58: 287-8.
- 13) **Santos C.** Cáncer de cérvix uterino en el Perú. *Rev Méd* 1994; 1: 475.
- 14) **Bethesda workshop.** The revised Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: report of the 1991 Bethesda workshop. *Acta Cytologica* 1992; 36(3): 273-6.
- 15) **Richart RM, Barron BA.** A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1969; 105: 386-93.