
Detección molecular y genotipificación del virus del papiloma humano en el Instituto Oncológico Nacional ION-SOLCA del Ecuador.

Molecular detection and genotype classification of human papillomavirus in the National Oncology Institute NOI-SOLCA of Ecuador.

Lindsay Karen García Rodríguez.*

Ramiro Israel Burgos Galárraga*

Juan Carlos Ruiz Cabezas**

José Rubén Valle Giler***

Daniela Egas Béjar***

Édison Patricio Valle Giler****

RESUMEN

Pocos son los datos que existen en la población ecuatoriana referentes a la infección por virus del papiloma humano (VPH), entidad íntimamente relacionada con el cáncer de cérvix, patología que según estadísticas del ION-SOLCA, representa el 51% de las neoplasias malignas detectadas en mujeres. Realizamos un estudio transversal junto con el personal del servicio de colposcopia del ION SOLCA. Tomamos muestras citológicas cervicales a 15 pacientes altamente sospechosas de estar infectadas con VPH. Se extrajo el ADN de dichas muestras y se identificó y genotipificó el virus por medio de PCR en tiempo real y PCR-dot blot reverso (INNO-LiPA HPV Genotyping v2) respectivamente. Todas las pacientes fueron positivas para VPH. Los genotipos encontrados fueron: 6, 11, 31, 40, 51, 52, 53, 59 y 68. El 80% de los pacientes mostró infección con más de un genotipo del VPH. No se encontró ningún paciente con genotipo 16 y/o 18.

Palabras clave: Virus del papiloma humano. VPH. Genotipificación. PCR en tiempo real. PCR dot-blot reverso.

SUMMARY

There are not much information in the Ecuadorian population about human papillomavirus infection (HPV), is associated with cervix cancer, pathology that represent 51% of malignant neoplasm detected in women according to the NOI-SOLCA statistics. It took cervical cytology samples to 15 patients with high risk of be infected by HPV. It got DNA of these samples and it realized a identification a genotype classification of virus by a PCR in real time and reverse PCR-dot blot (INNO-LiPA HPV Genotyping v2). All the patients were positive for HPV. The genotypes founded were: 6, 11,31,40,51,52,53,59 and 68. The 80% of all patients showed infection with more one genotype of HPV. It was not found any patient with genotype 16 and/or 18.

Key words: Human Papillomavirus. Genotyping. HPV. PCR in real time. Reverse PCR dot-blot.

Introducción

La infección con genotipos del virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo es una causa bien establecida del desarrollo de cáncer de cérvix¹³, patología que es la segunda neoplasia maligna más común en mujeres de todo el mundo⁸ y que según estadísticas del ION-SOLCA (años 1990 al

2000), constituye el 51% de todos los cánceres detectados en la población femenina que acude a dicho instituto¹¹. Los genotipos virales que poseen dicho factor de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82) para generar cáncer de cuello uterino están implicados

114 * Biólogo, Unidad de Genética, Sociedad de lucha contra el cáncer (SOLCA), Guayaquil – Ecuador.

** Médico, Jefe Unidad de Genética, Sociedad de lucha contra el cáncer (SOLCA), Guayaquil – Ecuador.

***Médico, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Ecuador.

****Médico adscrito, Unidad de Genética, Sociedad de lucha contra el cáncer (SOLCA), Gye – Ecuador.

en el desarrollo del 95 a 99% de este tipo de neoplasia^{8,13}.

Técnicas de detección temprana y genotipificación molecular del VPH como la reacción en cadena de la polimerasa convencional (polimerase chain reaction, PCR), PCR en tiempo real (Real Time-PCR) e hibridación con sondas, se están convirtiendo en importantes herramientas de los protocolos de prevención y manejo del cáncer cervical in situ⁷. Es así por ejemplo que la PCR convencional posee una sensibilidad del 89.3% y especificidad cercana al 94% para la detección del VPH^{4,12}, de manera que reduce los falsos negativos de las técnicas convencionales (citología, colposcopia, inmuno-histoquímica, etc.)^{3,4,14}

Teniendo en cuenta que en nuestra población existe una gran incidencia de cáncer de cuello uterino, resultó imprescindible implementar el análisis y genotipificación molecular del VPH como método para conocer cuáles son los genotipos de alto riesgo que más frecuentemente afectan a nuestros pacientes, de manera que a futuro se puedan implementar conductas de manejo más adecuadas en dichos pacientes.

Materiales y Métodos

Se coordinó con el departamento de colposcopia del ION SOLCA de Guayaquil la recolección de muestra citológicas cervicales de 15 pacientes altamente sospechosas o ya diagnosticadas con infección por VPH (presencia de coilocitos, condilomas acuminados y/o neoplasias). Las muestras fueron tomadas con cytobrush y espátula de Ayre, y se las preservó en solución de lisis celular para luego extraer el ADN total de acuerdo al protocolo del fabricante (Kit Wizard de extracción de ADN – Promega).

La detección del virus del papiloma humano se realizó mediante PCR en tiempo real con LightCycler®FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I. Los cebadores utilizados fueron GP5+ y GP6+ que amplifican la región consenso L1 del genoma viral, específico para la identificación del papilomavirus humano. La muestra fue considerada positiva para VPH si presentaba un pico superior a los 75°C promedio en el análisis de la temperatura de fusión (“melting”) (tabla 1).

Tabla 1

	Temperatura	Tiempo	Velocidad de cambios de temperatura	Detección	No. De ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	15 minutos	20°C/seg	NO	1
Amplificación	94°C	10 segundos	20°C/seg	NO	35
	50°C	10 segundos	20°C/seg	NO	
	72°C	15 segundos	20°C/seg	SI/simple	
Fusión	95°C	10 segundos	20°C/seg	NO	1
	50°C	5 segundos	20°C/seg	NO	
	97°C	0 segundos	0,1°C/seg	SI/ constante	
Enfriamiento	40°C	30 segundos	20°C/seg	NO	1
Secuencia de los cebadores	GP5	5'-TTTGTACTGTGGTAGATACTAC-3'			
	GP6	5'-GAAAAATAAAGTAAATCATATTC-3'			

Tabla 1: Condiciones de Amplificación por PCR en tiempo real¹. **Leyenda:** 1. Equipo LightCycler 1.5 y software versión 3.5. **Fuente:** Unidad de Genética ION Solca.

La identificación del genotipo viral se realizó por PCR-dot blot reverso (INNO-LiPA HPV Genotyping v2), siguiendo las indicaciones del fabricante (tabla 2). El resultado de esta hibridación in situ fue interpretado luego de verificar los números de bandas reactivas resultantes del proceso de hibridación (figura).

Tabla 2

Proceso	Segmento	Temperatura	Tiempo	No. de ciclos	Agitación ²
Amplificación por PCR¹	Hold	94°C	5 minutos	45 ciclos	
	Amplificación	94°C	30 segundos		
		52°C	45 segundos		
		72°C	45 segundos		
	Extensión final	72°C	5 minutos		
Preservado	4°C	indefinido			
Genotipo por dot – blot reverso³	Desnaturalización	ambiente	5 minutos	x 3	No
	Hibridación	49°C	1 hora		Sí
	Lavado fuerte	ambiente	20 segundos		Sí
		49°C	30 minutos		Sí
	Conjugado	ambiente	30 minutos		Sí
	Revelado	ambiente	30 minutos		Sí

Tabla 2: condiciones de amplificación y detección de genotipo por PCR-dot blot reverso. **Leyenda:** 1 Equipo Perkin-Elmer 2400; 2 Baño maría con agitación (Stuart Scientific) a 80 r.p.m; 3 INNO-LiPA HPV Genotyping v2 **Fuente:** Unidad de Genética ION Solca.

Figura

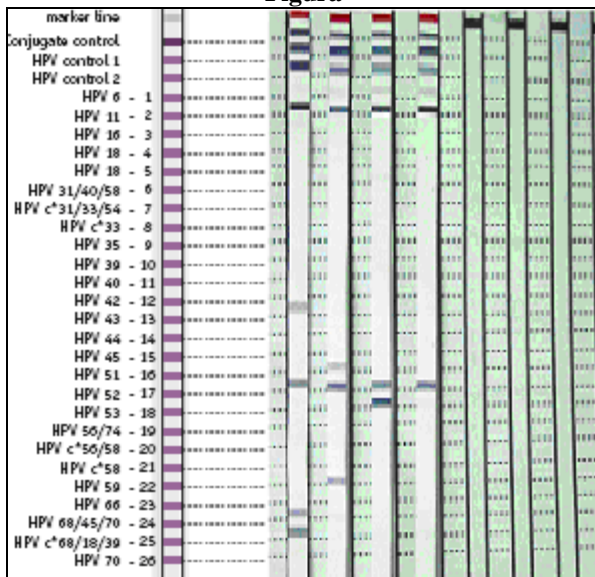


Figura 1: Interpretación de las bandas reactivas.
Fuente: Unidad de Genética ION Solca.

Resultados

Por medio de PCR en tiempo real se comprobó que el 100% de nuestra muestra (15 pacientes) fue positiva para la infección con VPH. El 80% de la muestra (12 pacientes) presentó infección con múltiples genotipos de VPH, con un 53.33% (ocho pacientes) presentando infección con tres o más genotipos (tabla 3). Las variantes encontradas y sus frecuencias están representadas en la tabla 4. El 73,3% de nuestra muestra (11 pacientes), independientemente de la infección múltiple, presentó infección con algún genotipo de alto riesgo (variantes 31, 51, 52, 68 y 59) de desarrollo de cáncer cervical.

Tabla 3

Casos	Genotipos encontrados			
	Infección simple		Infección múltiple	
	Bajo riesgo	Alto riesgo	Bajo riesgo	Alto riesgo
1			6, 11, 53	
2			53, 40	
3	11			
4			11, 53, 40	
5		52		
6		52		
7			6, 11	31
8			11	31, 52
9			53	52
10			6, 11	52
11			11	52
12			6, 11, 43	52, 68
13			11	52, 51, 59
14			11, 53	52
15			11	52
Porcentaje	20%		80%	

Tabla 3: Genotipos: porcentajes de infección simple y múltiple en pacientes con HPV ION SOLCA.
Fuente: Unidad de Genética ION Solca.

Los genotipos más frecuentes fueron las variantes 11 y 52 (tabla 4), de bajo y alto riesgo respectivamente, y curiosamente no se encontró ningún paciente infectado con VPH 16 o 18 (tabla 3 y 4), dos de los genotipos más frecuentes a nivel mundial.

Tabla 4

Genotipo	Frecuencia	Porcentaje según genotipos n=38
HPV 11	11	28,95
HPV 52	10	26,32
HPV 53	5	13,16
HPV 6	4	10,53
HPV 31	2	5,26
HPV 40	2	5,26
HPV 51	1	2,63
HPV 59	1	2,63
HPV 43	1	2,63
HPV 68	1	2,63
Total	38	100%

Tabla 4: genotipos: frecuencias y porcentajes encontrados en pacientes del ION SOLCA.
Fuente: Unidad de Genética ION Solca.

Discusión y conclusiones

La recolección de muestras para el análisis molecular del VPH se acopla al uso de las mismas herramientas empleadas en un papanicolau o coloscopia⁶, de manera que se puede incluir dicho estudio dentro del examen ginecológico de rutina sin ningún tipo de complicaciones⁵.

La PCR es una técnica molecular in vitro que copia y amplifica millones de veces un segmento de ADN¹⁰. En el caso del VPH, posee un alto nivel de sensibilidad en cuanto a su identificación⁴, por lo que se ha convertido en una herramienta importante en el diagnóstico de este tipo de infección.

La PCR en tiempo real (RT - PCR) está difundándose cada vez más a nivel mundial como técnica para identificar infección por VPH, ya que además de tener la misma sensibilidad y especificidad que la PCR convencional, permite analizar mayor cantidad de casos en un período determinado⁹. Esto se debe a que emplea menor tiempo en los cambios de temperatura y a que tiene un sistema automático de interpretación de resultados, impidiendo el gasto innecesario de materiales para su interpretación⁹.

El 73,3% de nuestros casos presentó por lo menos un genotipo de VPH de alto riesgo. El conocer el genotipo del VPH se está convirtiendo en un arma

fundamental para tomar decisiones clínicas y preventivas correctas en los pacientes infectados con virus de alto riesgo³. La genotipificación aumenta el valor predictivo negativo de la citología cervical de un 96-97% a un 99%⁷, reduciendo drásticamente los falsos negativos que se puedan dar al utilizar la citología cervical como método único de screening para el cáncer de cérvix. Al mismo tiempo, y debido a que las lesiones de alto grado (>CIN 3) sólo se desarrollan en presencia de genotipos de alto riesgo³, permite clasificar de manera más adecuada aquellas pacientes que realmente requieren de colposcopia y permite prolongar el periodo inter-control de las mujeres que presentan una citología border-line y que no poseen genotipos de alto riesgo^{3,4}. Todas estas ventajas de la genotipificación del VPH justifican el costo adicional que pueda incrementarse a las políticas de screening y prevención del cáncer de cérvix³.

En cuanto a la frecuencia de los diferentes tipos de virus; para nuestra población la variante 11 predominó en un 28.95% seguido por la variante 52 con un 26.32%. Curiosamente, el 80% de la muestra de este estudio presentó infección con múltiples genotipos de VPH y no se identificó ninguna paciente con genotipos 16 y 18, dos de los principales agentes relacionados con el desarrollo de cáncer cervical². Los datos sobre la infección con múltiples genotipos de VPH son contradictorios; algunos estudios dan muestra de una clara relación entre infección múltiple, persistencia crónica de la infección y desarrollo de cáncer de cérvix, mientras que otras series simplemente no encuentran ninguna relación entre dichos eventos^{7,1}. En nuestra población, y debido al alto porcentaje de pacientes que presentan infección múltiple, probablemente éste sería un factor importante en el desarrollo de cáncer de cérvix, lo que sugiere llevar un control más frecuente y adecuado en este tipo de pacientes.

Finalmente, es importante establecer que el uso de técnicas moleculares para identificar VPH inclusive se aplica al control inicial que se realiza en todas las mujeres que acuden a un control ginecológico por primera vez, ya que permite distanciar los controles, disminuyendo las molestias típicas del examen ginecológico y reduciendo drásticamente el empleo de recursos económicos, materiales y humanos⁴.

Referencias bibliográficas

1. Baseman JG, Koutsky LA.: The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology*. 32S: S16-S24, 2005.
2. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV: The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 55:244-265, 2002.
3. Brink AA, Zielinski GD, Steenberg RDM, Snijders PJF, Meijer CJLM: Clinical relevance of human papillomavirus testing in cytopathology. *Cytopathology*; 16:7-12, 2005.
4. Cuschieri KS, Cubie H: The role of human papillomavirus testing in cervical screening. *Journal of Clinical Virology*. 32S:S34-S42, 2005.
5. Herrington CS: What we could do now: Molecular Pathology of Gynaecological Cancer. *J Clin Pathol: Mol Pathol*. 54:222-224, 2001.
6. Lörincz AT., Richart RT., Human Papillomavirus DNA Testing as an Adjunct to Cytology in Cervical Screening Programs, (*Arch Pathol Lab Med*; 127:959-968), 2003.
7. Molijn A., Kleter B, Quint W, van Doorn L-J: Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of Clinical Virology*. 32S:S43-S51, 2005.
8. Muñoz N, Bosch FX, De Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PF, Meijer CJ.: Epidemiologic classification of human Papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 348:518-27, 2003.
9. PCR Applications Manual, Roche Molecular Biochemicals 2nd Edition., Germany 2000.
10. Puertas M.J.: Genética Fundamentos y Perspectivas Segunda Edición., Madrid-España 1999.
11. Registro Nacional de Tumores Cancer en Guayaquil, Sociedad de Lucha contra el Cancer Sede Nacional Instituto Oncologico Nacional Dr. Juan Tanca Marengo Guayaquil-Ecuador, 1997-2000.
12. Schneider A, Hoyer H, Lotz B, Leistrizta S, Kühne-Heid R, Nindl I, Müller B, Haerding J, Dürst M.: Screening for High grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer by testing for high-risk HPV, routine cytology or colposcopy. *Int J Cancer*. 89:529-534, 2000.
13. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJF, Peto J, Meijer CJLM, Muñoz N.: Human papilloma virus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 189:12-19, 1999.
14. Zazove P, Reed BD, Gregoire L, Ferenczy A, Gorenflo DW, Lancaster WD: Low false-negative rate of PCR analysis for detecting Human Papillomavirus-related cervical lesions. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 36, No. 9:2708-2713, Septiembre. 1998.

Dr. Edison Patricio Valle

Teléfonos: 593-04-2278462; 097324515

Correo electrónico: patovalleg@gmail.com

Fecha de presentación: 24 de febrero de 2006

Fecha de publicación: 31 de julio de 2006

Traducido por: Srta. Brenda Gilbert, estudiante X ciclo, carrera de Medicina.