

T 578822/11
5/11
at

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Dpto. de FISIOLÓGIA ANIMAL



**ESTUDIO DE LA INFECCION POR EL VIRUS DEL PAPILOMA
HUMANO (HPV) EN BIOPSIAS DEL TRACTO GENITAL
FEMENINO INFERIOR MEDIANTE TECNICAS DE
INMUNOHISTOQUIMICA E HIBRIDACION IN SITU**



FERNANDO GOMEZ AGUADO

Madrid, 1994

R- 22.126

Vº Bº EL DIRECTOR

ANTONIO LOPEZ BRAVO

FERNANDO GOMEZ

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas e instituciones que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, y de forma especial, a mi director de tesis, el Dr. Antonio López Bravo, Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del C.I.C., por la confianza que ha depositado en mí, su dedicación y por poner a mi disposición su excelente biblioteca personal.

A la Dra. Ma José Alonso, Jefa de Sección del mismo Servicio, por su ilusión, el gran apoyo prestado y su incansable tesón.

Al Dr. Agustín Bullón, Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Salamanca, por permitirme el acceso a su archivo y a los Dres. José J. Paz, Ma. Mar Abad, Elisa Muñoz y Ma Luisa Nájera por las facilidades y la ayuda prestada en la revisión del mencionado archivo.

Al Dr. F. Cermeño, por las piezas del archivo de Anatomía Patológica del Hospital Nuestra Señora de Sonsoles de Avila.

A los Dres. Noemi Romero, ginecóloga del Centro Penitenciario Femenino de Madrid, Ma Jesús Cancelo, ginecóloga del Centro de Orientación Familiar de Guadalajara y J. Campillo, ginecólogo del Ayuntamiento de Madrid, por su desinteresada colaboración en la obtención de nuevas muestras.

A mis compañeros y amigos del Servicio de Anatomía Patológica del C.I.C., Ana Picazo, Ma. Teresa Corcuera y Manuel Roldán, por su gran ayuda y continuo aliento; a todo el personal del laboratorio general de técnicas histológicas, en especial a Angel Blanco y Marina Capa, por la realización de los cortes y técnicas de rutina; y a Isabel Curiel, becaria del servicio, por su inestimable ayuda.

Al Dr. Ricardo Martínez, modelo de constancia científica, por su continuo

apoyo.

Quisiera también agradecer de forma especial al Dr. José Sanz Tobes las facilidades dadas y su continuo aliento.

Finalmente, a mi mujer, por la gran paciencia demostrada, el cariño derrochado y su eterna comprensión, y a mi hijo, que espero sepa perdonarme el tiempo que no he pasado con él.

*A Lucía, mi mujer,
a Javier, mi hijo,
y a mis padres.*

ABREVIATURAS

A	: Adenina.
ABC	: Complejo avidina-biotina.
ADN	: Acido desoxirribonucleico.
AEC	: Amino-etil-carbazol.
APAAP	: Fosfatasa alcalina-anti-fosfatasa alcalina.
ARN	: Acido ribonucleico.
ATCC	: American Type Culture Collection.
BBS	: Tampón borato salino.
BCIP	: Bromo-cloro-indol-fosfato.
BPV	: Virus del papiloma bovino.
BSA	: Albúmina bovina.
C	: Citosina.
CIN	: Neoplasia intraepitelial cervical.
CIN I	: Neoplasia intraepitelial cervical grado I.
CIN II	: Neoplasia intraepitelial cervical grado II.
CIN III	: Neoplasia intraepitelial cervical grado III.
CIS	: Carcinoma <i>in situ</i> .
COF	: Centro de orientación familiar.
CPF	: Centro Penitenciario Femenino.
DAB	: Diaminobencidina.
DMF	: Dimetilformamida.
DMSO	: Dimetilsulfóxido.
DPV	: Virus del papiloma del ciervo.
EDTA	: Etilen-diamino-tetra-acético.
G	: Guanina.
HE	: Hematoxilina-eosina.
HIS	: Hibridación <i>in situ</i> .
HPV	: Virus del papiloma humano.
HSIL	: Lesión intraepitelial escamosa de alto grado.
IHQ	: Inmunohistoquímica.
LCR	: Región control larga.
LSIL	: Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado.
NBT	: Azul de nitrotetrazolio.
NCR	: Región no codificante.

OR : Razón de ventaja.
ORF : Pauta de lectura abierta.
PAP : Peroxidasa-anti-peroxidasa.
PBS : Tampón fosfato salino.
PCR : Reacción en cadena de la polimerasa.
PV : Virus del papiloma.
RR : Riesgo relativo.
SDS : Dodecil sulfato sódico.
SIL : Lesión intraepitelial escamosa.
SSC : Solución citrato salina.
T : Timina.
t.a. : Temperatura ambiente.
Tm : Temperatura de fusión.
URR : Región reguladora ascendente.
VaIN : Neoplasia intraepitelial vaginal.
VIN : Neoplasia intraepitelial vulvar.
VIN I : Neoplasia intraepitelial vulvar grado I.
VIN II : Neoplasia intraepitelial vulvar grado II.
VIN III : Neoplasia intraepitelial vulvar grado III.

INDICE DE FIGURAS

<u>FIGURA</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>PAGINA</u>
I.1.	Reproducción del libro "De las Enfermedades de los Ejercitos".....	3
I.2.	Comparación de la organización genómica de varios HPV.....	11
I.3.	Tipos de infección genital por HPV.....	15
I.4.	Condilomas acuminados en vulva y región perineal.....	19
I.5.	Imagen colposcópica de lesión acetoblanca en cérvix.....	20
I.6.	Condiloma acuminado de vulva.....	20
I.7.	Condiloma plano de cérvix.....	21
I.8.	LSIL (displasia leve / CIN I).....	24
I.9.	HSIL (displasia moderada / CIN II).....	24
I.10.	HSIL (displasia severa / CIN III).....	25
I.11.	HSIL (Carcinoma <i>in situ</i> / CIN III).....	25
I.12.	Carcinoma escamoso de cérvix bien diferenciado.....	31
I.13.	Carcinoma escamoso de cérvix moderadamente diferenciado.....	31
I.14.	Carcinoma indiferenciado de cérvix.....	32
I.15.	Carcinoma verrucoso de vulva.....	33
I.16.	Adenocarcinoma de cérvix.....	34
I.17.	Imagen colposcópica de lesión yodo-negativa de cérvix...	38
I.18.	Frotis vaginal con un coilocito.....	41
I.19.	Frotis vaginal con un coilocito binucleado.....	41
I.20.	Placa de hiperqueratosis en un frotis vaginal.....	42
I.21.	Frotis cérvico-vaginal diagnosticado de HSIL.....	43
I.22.	Microfotografía electrónica de agrupaciones intranucleares de HPV.....	45
III.1.	Distribución porcentual de biopsias de vulva por procedencias.....	69
III.2.	Distribución porcentual de biopsias de cérvix por procedencias.....	70

<u>FIGURA</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>PAGINA</u>
III.3.	Medida de la longitud de epitelio en una biopsia por análisis de imagen.....	76
IV.1.	Distribución porcentual de lesiones encontradas en vulva.	93
IV.2.	Distribución porcentual de lesiones de vulva compatibles o no con infección por HPV.....	93
IV.3.	Distribución porcentual de lesiones encontradas en cérvix	96
IV.4.	Distribución porcentual de lesiones cervicales compatibles o no con infección por HPV.....	96
IV.5.	Distribución porcentual de lesiones cervicales en biopsias de archivo y de nueva obtención.....	97
IV.6.	Condiloma acuminado de vulva positivo para HPV por inmunohistoquímica.....	100
IV.7.	Detalle de coilocitos positivos para HPV por inmunohistoquímica.....	101
IV.8.	Células CaSki positivas para HPV por hibridación <i>in situ</i>	103
IV.9.	Células HeLa positivas para HPV por hibridación <i>in situ</i> .	104
IV.10.	Condiloma acuminado positivo para HPV por HIS-detección.....	104
IV.11.	Resultados de HIS-detección en biopsias de vulva y cérvix según el tamaño mínimo de las mismas.....	107
IV.12.	Resultados de HIS-detección en lesiones cervicales según la longitud mínima de epitelio.....	108
IV.13.	Resultados de HIS-detección en biopsias cervicales con menos de 5 mm de epitelio, entre 5 y 9 mm y más de 9 mm.....	109
IV.14.	Comparación de los resultados de HIS-detección en lesiones cervicales con menos de 5 mm, entre 5 y 9 mm y más de 9 mm de epitelio.....	110
IV.15.	Resultados porcentual de HIS-tipado en biopsias de cérvix.....	113
IV.16.	Patrón de marcaje uniforme por hibridación <i>in situ</i>	115
IV.17.	Patrón de marcaje puntual por hibridación <i>in situ</i>	115
IV.18.	Patrón de marcaje mixto por hibridación <i>in situ</i>	116
IV.19.	Relación entre patrón de marcaje y tipos virales en condilomas acuminados de vulva.....	117

<u>FIGURA</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>PAGINA</u>
IV.20.	Clasificación de biopsias cervicales por lesiones y patrón de marcaje.....	118
IV.21.	Relación entre tipos virales y patrón de marcaje en biopsias cervicales.....	119
IV.22.	Relación entre tipos virales y patrón de marcaje en condilomas acuminados de cérvix.....	119
IV.23.	Relación entre tipos virales y patrón de marcaje en LSIL.	120
IV.24.	Relación entre tipos virales y patrón de marcaje en HSIL	120
IV.25.	Relación entre tipos virales y patrón de marcaje en carcinomas cervicales.....	121
IV.26.	Patrón de distribución multifocal.....	124
IV.27.	Patrón de distribución aislado.....	125
IV.28.	Relación entre tipos virales y patrón de distribución en condilomas acuminados de vulva.....	126
IV.29.	Clasificación de biopsias de cérvix según el patrón de distribución.....	127
IV.30.	Relación entre tipos virales y patrón de distribución en biopsias de cérvix.....	128
IV.31.	Relación entre tipos virales y patrón de distribución en condilomas acuminados de cérvix.....	129
IV.32.	Relación entre tipos virales y patrón de distribución en LSIL.....	129
IV.33.	Relación entre tipos virales y patrón de distribución en HSIL.....	130
IV.34.	Relación entre tipos virales y patrón de distribución en carcinomas cervicales.....	130
IV.35.	Reacción positiva por hibridación <i>in situ</i> en el tercio superior de un epitelio.....	132
IV.36.	Reacción positiva por hibridación <i>in situ</i> en el tercio medio de un epitelio.....	132
IV.37.	Reacción positiva por hibridación <i>in situ</i> que alcanza el tercio inferior de un epitelio.....	133
IV.38.	Clasificación de biopsias cervicales según la posición relativa de células positivas en el grosor del epitelio.....	135
IV.39.	Relación entre tipos virales y posición relativa de células positivas en el grosor del epitelio en biopsias cervicales...	135

<u>FIGURA</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>PAGINA</u>
IV.40.	Resultados porcentuales de positividad con hibridación <i>in situ</i> e inmunohistoquímica en biopsias de vulva.....	141
IV.41.	Resultados porcentuales de positividad con hibridación <i>in situ</i> e inmunohistoquímica en biopsias de cérvix.....	141
IV.42.	Comparación de las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación <i>in situ</i> en un condiloma acuminado de vulva.	142
IV.43.	Relación entre patrón de marcaje y compatibilidad con infección por HPV en biopsias cervicales.....	145
IV.44.	Relación entre patrón de distribución y compatibilidad con infección por HPV en biopsias cervicales.....	146
IV.45.	Combinación de inmunohistoquímica e hibridación <i>in situ</i> en una biopsia de cérvix.....	150
IV.46.	Detalle del doble marcaje en una biopsia de vulva.....	151

INDICE DE TABLAS

<u>TABLA</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>PAGINA</u>
I.I.	Estructura de la familia Papovaviridae.....	8
I.II.	Organización genómica de los virus del papiloma.....	12
I.III.	Sistemas de clasificación de lesiones cervicales premalignas.....	27
I.IV.	Técnicas utilizadas en el diagnóstico de la infección genital por HPV.....	37
I.V.	Técnicas de biología molecular empleadas en el diagnóstico de la infección por HPV.....	59
III.I.	Distribución de las biopsias estudiadas por procedencias.....	69
IV.I.	Clasificación de biopsias de vulva por lesiones.....	92
IV.II.	Clasificación de biopsias de cérvix por lesiones.....	95
IV.III.	Clasificación de las biopsias según la longitud de su epitelio.....	98
IV.IV.	Clasificación de biopsias de vulva por lesiones y longitud de epitelio.....	99
IV.V.	Clasificación de biopsias de cérvix por lesiones y longitud de epitelio.....	99
IV.VI.	Resultado de la inmunohistoquímica en biopsias de vulva.....	102
IV.VII.	Resultado de la inmunohistoquímica en biopsias de cérvix.....	102
IV.VIII.	Resultado de la HIS-detección en biopsias de vulva...	105
IV.IX.	Resultado de la HIS-detección en biopsias de cérvix..	106
IV.X.	Relación entre HIS-detección y longitud de epitelio....	107
IV.XI.	Relación entre HIS-detección y longitud de epitelio en lesiones cervicales.....	108
IV.XII.	Resultados de HIS-tipado en biopsias de vulva.....	111
IV.XIII.	Resultados de HIS-tipado en biopsias cervicales.....	112
IV.XIV.	Resultados de HIS-tipado en biopsias cervicales sin infección múltiple.....	113

<u>TABLA</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>PAGINA</u>
IV.XV.	Clasificación de biopsias de vulva por lesiones y por patrón de marcaje.....	116
IV.XVI.	Relación entre tipos virales y patrón de marcaje en biopsias de vulva.....	117
IV.XVII.	Clasificación de biopsias cervicales según la inmunohistoquímica y el patrón de marcaje.....	121
IV.XVIII.	Clasificación de las biopsias estudiadas por lesiones según el patrón de marcaje puntual.....	122
IV.XIX.	Clasificación de las biopsias estudiadas por lesiones según el patrón de marcaje uniforme.....	122
IV.XX.	Clasificación de biopsias de vulva según el patrón de distribución.....	125
IV.XXI.	Relación entre tipos virales y patrón de distribución en biopsias de vulva.....	126
IV.XXII.	Clasificación de biopsias cervicales por inmunohistoquímica y patrón de distribución.....	131
IV.XXIII.	Clasificación de biopsias de vulva según la posición relativa de células positivas en el grosor del epitelio..	134
IV.XXIV.	Relación entre tipos virales y posición relativa de células positivas en el grosor del epitelio en biopsias de vulva.....	134
IV.XXV.	Clasificación de biopsias de cérvix según los patrones de marcaje y distribución.....	136
IV.XXVI.	Relación entre tipos virales y patrones de marcaje y distribución en biopsias de cérvix.....	137
IV.XXVII.	Clasificación de las biopsias estudiadas por patrones de marcaje y distribución.....	137
IV.XXVIII.	Comparación entre inmunohistoquímica e hibridación <i>in situ</i> en biopsias de vulva.....	139
IV.XXIX.	Comparación entre inmunohistoquímica e hibridación <i>in situ</i> en biopsias de cérvix.....	139
IV.XXX.	Comparación de resultados obtenidos en biopsias de vulva compatibles o no con infección por HPV.....	144
IV.XXXI.	Comparación de resultados obtenidos en biopsias de cérvix compatibles o no con infección por HPV.....	144

<u>TABLA</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>PAGINA</u>
IV.XXXII.	Resultados de HIS-tipado en biopsias cervicales compatibles o no con infección por HPV.....	145
IV.XXXIII.	Comparación de resultados en biopsias de vulva de archivo y nueva obtención.....	147
IV.XXXIV.	Comparación de resultados en biopsias de cérvix de archivo y nueva obtención.....	147
IV.XXXV.	Resultados de inmunohistoquímica en biopsias cervicales por procedencias.....	148
IV.XXXVI.	Resultados de HIS-detección en biopsias cervicales por procedencias.....	149
IV.XXXVII.	Resultados de HIS-tipado en biopsias cervicales por procedencias.....	149
V.I.	Comparación de resultados obtenidos por diversos autores con hibridación <i>in situ</i> en biopsias cervicales..	165
V.II.	Comparación de resultados obtenidos por diversos autores con HIS-tipado en biopsias cervicales.....	174
V.III.	Estrategias utilizadas por diversos autores para combinar inmunohistoquímica e hibridación <i>in situ</i>	198

INDICE

	<u>PAGINA</u>
I. INTRODUCCION	1
I.1. INFECCION GENITAL POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO: PERSPECTIVA HISTORICA.....	2
I.2. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.....	7
I.2.1. Taxonomía.....	7
I.2.2. Clasificación.....	8
I.2.3. Estructura del virión.....	9
I.2.4. Organización del genoma.....	10
I.2.5. Biología viral.....	13
I.2.5.1. Infección latente.....	14
I.2.5.2. Infección productiva.....	16
I.2.5.3. Infección no productiva.....	17
I.3. LESIONES GENITALES ASOCIADAS A HPV.....	18
I.3.1. Condiloma.....	19
I.3.2. Lesiones no invasivas con potencialidad de evolución maligna.....	22
I.3.2.1. Terminología clásica.....	22
I.3.2.2. Clasificación CIN.....	26
I.3.2.3. Sistema de Bethesda.....	27
I.3.3. Lesiones invasivas.....	29
I.3.3.1. Carcinoma escamoso de cérvix.....	29
I.3.3.2. Carcinoma verrucoso.....	32
I.3.3.3. Carcinoma de células pequeñas.....	33
I.3.3.4. Adenocarcinoma de cérvix.....	33
I.3.4. Tipos de HPV asociados con diferentes lesiones.....	34
I.4. DIAGNOSTICO DE LA INFECCION GENITAL POR HPV.....	36
I.4.1. Observación clínica de las lesiones.....	37
I.4.1.1. Observación directa.....	37

	<u>PAGINA</u>
I.4.1.2. Colposcopia.....	38
I.4.2. Diagnóstico anatomopatológico.....	40
I.4.2.1. Citología exfoliativa cérvico-vaginal.....	40
I.4.2.2. Biopsia genital.....	44
I.4.3. Microscopia electrónica.....	45
I.4.4. Métodos inmunológicos.....	46
I.4.4.1. Serología.....	46
I.4.4.2. Inmunohistoquímica (IHQ).....	48
I.4.5. Hibridación de ácidos nucleicos.....	49
I.4.5.1. Teoría de hibridación.....	50
I.4.5.2. Southern blot.....	52
I.4.5.3. Dot blot.....	53
I.4.5.4. Reverse blot.....	54
I.4.5.5. Hibridación <i>in situ</i> en tejido (HIS).....	55
I.4.5.6. Hibridación <i>in situ</i> en filtro.....	60
I.4.5.7. Técnica sandwich.....	60
I.4.6. Amplificación de ADN: reacción en cadena de la polimerasa.....	61
II. OBJETIVOS	63
III. MATERIAL Y METODOS	66
III.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	67
III.2. MATERIAL.....	68
III.2.1. Biopsias genitales.....	68
III.2.1.1. Biopsias de archivo.....	70
III.2.1.2. Biopsias de nueva obtención.....	71
III.2.2. Líneas celulares.....	72
III.3. METODOS.....	72
III.3.1. Pretratamiento de los portaobjetos.....	73
III.3.2. Cultivo y procesamiento de las líneas celulares.....	74
III.3.3. Análisis de imagen.....	75
III.3.4. Inmunohistoquímica.....	77

	<u>PAGINA</u>	
III.3.5.	Hibridación <i>in situ</i>	80
III.3.5.1.	Técnica de detección.....	80
III.3.5.2.	Técnica de tipado.....	84
III.3.6.	Detección simultánea de antígenos y secuencias de ADN específicas de HPV.....	87
III.2.7.	Estadística.....	89
IV. RESULTADOS		90
IV.1.	CLASIFICACION DE LAS LESIONES.....	91
IV.1.1.	Biopsias de vulva.....	91
IV.1.2.	Biopsias de cérvix uterino.....	94
IV.2.	LONGITUD DE EPITELIO.....	97
IV.3.	INMUNOHISTOQUIMICA.....	100
IV.3.1.	Biopsias de vulva.....	101
IV.3.2.	Biopsias de cérvix uterino.....	102
IV.4.	HIBRIDACION <i>IN SITU</i>	103
IV.4.1.	Técnica de detección.....	103
IV.4.1.1.	Biopsias de vulva.....	105
IV.4.1.2.	Biopsias de cérvix uterino.....	105
IV.4.1.3.	Relación entre la técnica de HIS-detección para HPV y la longitud del epitelio presente en las biopsias.....	106
IV.4.2.	Técnica de tipado.....	110
IV.4.2.1.	Biopsias de vulva.....	111
IV.4.2.2.	Biopsias de cérvix uterino.....	111
IV.5.	PARAMETROS MORFOLOGICOS ASOCIADOS A LA HIBRIDACION <i>IN SITU</i>	114
IV.5.1.	Patrón de marcaje.....	114
IV.5.1.1.	Biopsias de vulva.....	116
IV.5.1.2.	Biopsias de cérvix uterino.....	118
IV.5.1.3.	Resultados globales.....	122
IV.5.2.	Patrón de distribución de las células positivas.....	124
IV.5.2.1.	Biopsias de vulva.....	125

	<u>PAGINA</u>
IV.5.2.2.	Biopsias de cérvix uterino..... 127
IV.5.3.	Posición relativa de las células positivas en el grosor del epitelio..... 131
IV.5.3.1.	Biopsias de vulva..... 133
IV.5.3.1.	Biopsias de vulva..... 133
IV.5.3.2.	Biopsias de cérvix uterino..... 134
IV.5.4.	Relación entre el patrón de marcaje y el patrón de distribución..... 136
IV.6.	ESTUDIOS COMPARATIVOS..... 138
IV.6.1.	Comparación entre inmunohistoquímica e hibridación <i>in situ</i> 138
IV.6.2.	Comparación entre biopsias compatibles y no compatibles histopatológicamente con infección por HPV..... 143
IV.6.3.	Comparación entre muestras de archivo y de nueva obtención..... 146
IV.6.4.	Procedencia geográfica..... 148
IV.7.	TECNICA DE DOBLE MARCAJE..... 150
V. DISCUSION	152
V.1.	CLASIFICACION DE LAS LESIONES..... 155
V.2.	LONGITUD DE EPITELIO..... 158
V.3.	INMUNOHISTOQUIMICA..... 160
V.4.	HIBRIDACION <i>IN SITU</i> 163
V.4.1.	Técnica de detección..... 163
V.4.1.1.	Relación entre la técnica de HIS-detección para HPV y la longitud del epitelio presente en las biopsias..... 167
V.4.2.	Técnica de tipado..... 170
V.4.2.1.	Biopsias de vulva..... 172
V.4.2.2.	Biopsias de cérvix uterino..... 173
V.5.	PARAMETROS MORFOLOGICOS ASOCIADOS A LA HIBRIDACION <i>IN SITU</i> 175
V.5.1.	Patrón de marcaje..... 175
V.5.1.1.	Biopsias de vulva..... 179
V.5.1.2.	Biopsias de cérvix uterino..... 180

	<u>PAGINA</u>
V.5.1.3. Resultados globales.....	181
V.5.2. Patrón de distribución de las células positivas.....	182
V.5.2.1. Biopsias de vulva.....	184
V.5.2.2. Biopsias de cérvix uterino.....	184
V.5.3. Posición relativa de las células positivas en el grosor del epitelio.....	186
V.5.3.1. Biopsias de vulva.....	186
V.5.3.2. Biopsias de cérvix uterino.....	186
V.5.4. Relación entre el patrón de marcaje y el patrón de distribución.....	187
V.6. ESTUDIOS COMPARATIVOS.....	188
V.6.1. Comparación entre inmunohistoquímica e hibridación <i>in situ</i>	188
V.6.2. Comparación entre biopsias compatibles y no compatibles histopatológicamente con infección por HPV.....	192
V.6.3. Comparación entre muestras de archivo y muestras de nueva obtención.....	195
V.6.4. Procedencia geográfica.....	196
V.7. TECNICA DE DOBLE MARCAJE.....	196
V.8. CONSIDERACIONES GLOBALES.....	199
VI. CONCLUSIONES	206
VII. BIBLIOGRAFIA	211

I. INTRODUCCION

I.1. INFECCION GENITAL POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO: PERSPECTIVA HISTORICA.

Los virus del papiloma constituyen un grupo de virus, cuyo material genético está constituido por ácido desoxirribonucleico (ADN), que infectan piel y mucosas y producen lesiones escamo-proliferativas en el hombre y en una gran variedad de animales.

La infección por el virus del papiloma humano (HPV, de la terminología inglesa "human papillomavirus") se ha descrito en un amplio abanico de localizaciones anatómicas, que incluye la región anogenital, uretra, piel, cavidades nasal y paranasal, cavidad oral, laringe, árbol traqueobronquial, esófago y conjuntiva¹⁻⁹.

La infección genital por HPV es una de las enfermedades de transmisión sexual más común hoy día y tiene una gran importancia sanitaria ya que este virus puede jugar un papel importante en el desarrollo de lesiones intraepiteliales escamosas y carcinomas¹⁰⁻¹³.

La relación entre actividad sexual y aparición de papilomas genitales era ya conocida en la época romana. Celso, en su "Libro VI de la Medicina"¹⁴ señala que "*...el condiloma es una excrescencia que de ordinario se origina después de una inflamación*".

En el siglo XVIII, el barón Van-Svieten hace referencia en su libro "De las Enfermedades de los Ejercitos"¹⁵ a las verrugas venéreas como pequeñas elevaciones que se forman en las papilas nerviosas de las partes genitales, y previamente señala que las causas del mal venéreo (en el que se incluyen las verrugas) son siempre un contagio (figura I.1).

A mediados del siglo XIX (1846), en el libro "Nuevos Elementos de Cirugía y Medicina"¹⁶, escrito por "algunos doctores en ambas ciencias", se encuentra ya

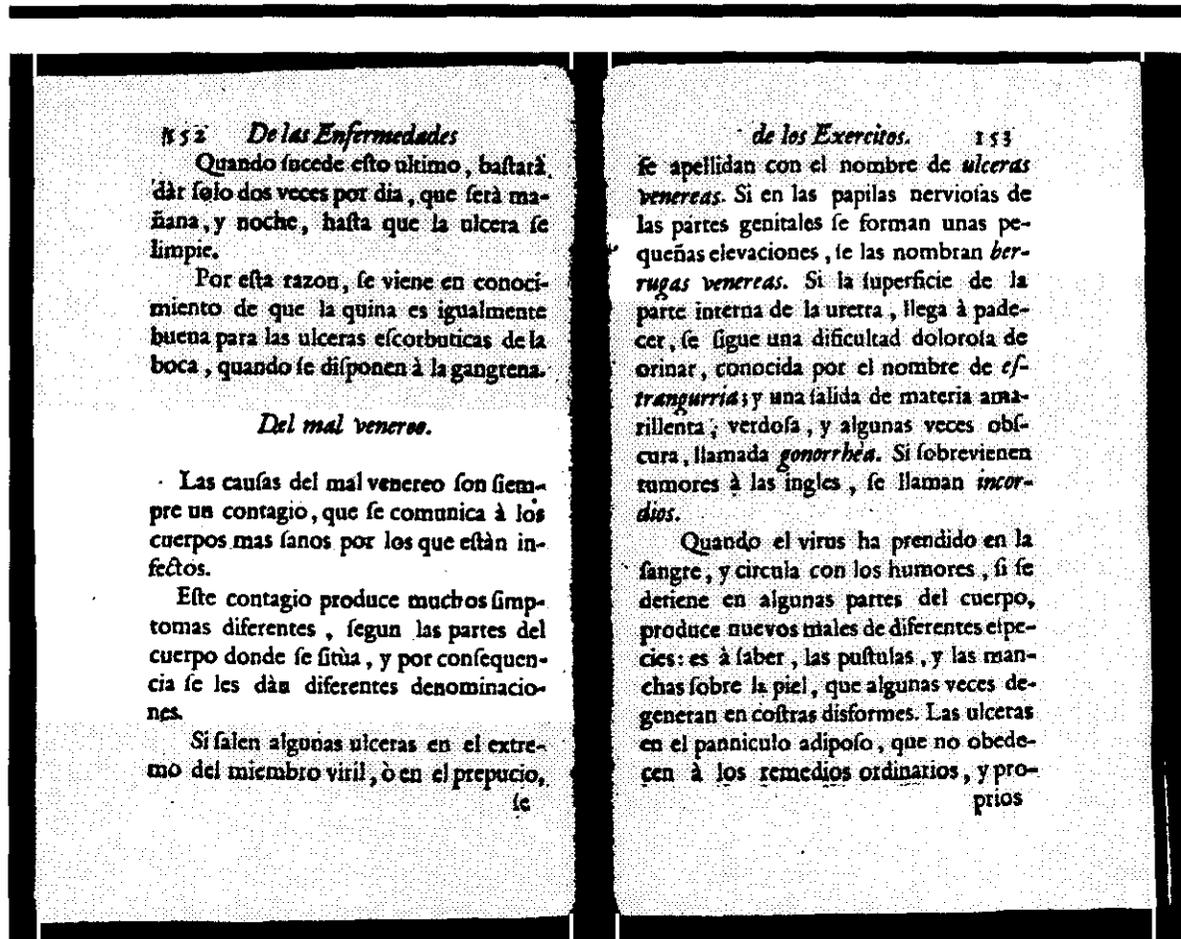


Figura I.1. Reproducción de las páginas del libro "De las Enfermedades de los Ejercitos" en las que se hace referencia a las verrugas venéreas.

una referencia a la transformación maligna de algunas verrugas.

Por la misma época (1848) Díaz Benito y González y Velasco¹⁷ escriben que "... la sangre que arrojan las verrugas es contagiosa. ... porque la sangre detenida allí debe alterarse en su cualidad, y comunicar cuando se pone en contacto con lo restante de la piel, un principio morbífico, absorbiéndose y dando lugar a un producto igual que el que le dio origen". Estos autores hacen también una breve descripción histológica de las verrugas.

Una descripción mucho más amplia de estas lesiones se encuentra, a finales del siglo XIX (1885) en el "Tratado Elemental de Histología Normal y

Patológica" del Dr. Maestre-de San Juan¹⁸, aunque no menciona ninguna etiología de las mismas.

En 1894, Variot¹⁹ demostró que las verrugas cutáneas podían transmitirse de persona a persona por inoculación de suspensiones celulares. Y a principios del siglo XX (1907) Ciuffo²⁰ observó que esta transmisión se podía realizar por inoculación de filtrados libres de células en los que además se eliminaban bacterias y levaduras, sugiriendo por primera vez el origen viral de estas lesiones.

Gross, en su libro "Oncogenic Viruses"²¹ cita un experimento realizado por Waelsch en 1917. Este investigador preparó una suspensión celular a partir de un condiloma acuminado genital y la inoculó en la piel de su propio brazo, en la de uno de sus colaboradores y en la mucosa adyacente al orificio vaginal de una voluntaria joven. Tras un período de tres meses de latencia, el Dr. Waelsch y su colaborador desarrollaron una verruga plana en el sitio de la inoculación, y la voluntaria desarrollo un condiloma acuminado típico. Al poco tiempo, en 1924, Serra²² demostró que el condiloma acuminado también se transmitía mediante filtrados libres de células.

En 1933, Shope²³ describió por primera vez papilomas en conejos ligados a un agente transmisible: el virus del papiloma.

Un año después (1934), Rous y Beard^{24,25} descubrieron que los papilomas de conejo tenían potencial maligno. Implantaron pequeños fragmentos de papilomas cutáneos de conejo en músculos y órganos internos de conejos y comprobaron que adquirían propiedades invasivas. Los fragmentos crecieron en los tejidos de alrededor e incluso se transformaron en carcinomas de células escamosas. Un año más tarde, en 1935, los mismos autores²⁶ informaron que algunos papilomas cutáneos de conejos domésticos, producidos por inoculación de filtrados de otros papilomas obtenidos en conejos salvajes, experimentaban una transformación espontánea a carcinoma de células escamosas.

Desde mediados del siglo XX, el diagnóstico citológico de las lesiones

precancerosas evolucionó rápidamente. En 1949, Ayer²⁷ describió cambios citológicos asociados a estadíos "precancerosos" tempranos, pero sin hablar todavía de "atipia coilocítica". Esta fue descrita por primera vez por Koss y Durfee²⁸ en 1956, asociada a un gran porcentaje de displasias cervicales. Y en 1960, Ayer²⁹ hipotetizó que la atipia coilocítica tenía un origen viral. Finalmente, en 1961, Naib y Masukawa³⁰ centraron el diagnóstico citológico del condiloma acuminado en la presencia de coilocitos.

En la década de los 70 varios autores señalaron la estrecha relación entre enfermedad venérea y carcinoma cervical y vulvar³¹⁻³³.

En 1976, Meisels y Fortin³⁴, y en 1977, Purola y Savia³⁵, identificaron la atipia coilocítica como un marcador de la infección genital por HPV.

También en 1976, zur Hausen³⁶ sugirió que el HPV era el principal virus oncogénico en el tracto genital.

A finales de los 70, se caracterizaron los primeros tipos de HPV genitales³⁷⁻⁴⁰ y en 1981, De Villiers, Gissman y zur Hausen⁴¹ publicaron la primera clonación del ADN de un HPV genital.

A partir de este momento, numerosos estudios ultraestructurales, inmunohistoquímicos y de hibridación de ácidos nucleicos demostraron la presencia de viriones, antígenos de la cápside y ADN de HPV, respectivamente, en un porcentaje elevado de condilomas, lesiones precancerosas y carcinomas genitales⁴²⁻⁴⁶.

En los últimos años se han identificado más de 65 tipos distintos de HPV⁴⁷, de los que 24 se han aislado en el tracto anogenital^{47,48} (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 y 59), y se ha establecido una estrecha relación entre determinados tipos de HPV y el desarrollo de procesos neoplásicos genitales. En este sentido, varios grupos han conseguido transformar líneas celulares continuas con HPV tipos 6⁴⁹, 16⁵⁰⁻⁵³ y

18^{49,51,54}; igualmente, otros grupos han conseguido transformar queratinocitos primarios con HPV tipos 16 y 18^{55,56}; y recientemente, se ha demostrado que el HPV tipo 16 es capaz de alterar la diferenciación epitelial en un modelo experimental *in vitro*⁵⁷.

A nivel molecular se ha demostrado la interacción de proteínas víricas con productos génicos de la célula huésped relacionadas con procesos neoplásicos. Concretamente se ha descrito la unión de las proteínas E6 y E7 de HPV 16 a la proteína del retinoblastoma⁵⁸ y a la proteína p53⁵⁹.

Dada la incapacidad para cultivar el virus *in vitro*, sobre líneas celulares, los estudios sobre el papel potencial de los productos génicos de HPV en la transformación neoplásica y la carcinogénesis se realizan sobre sistemas alternativos, como son el cultivo de queratinocitos transfectados^{60,61}, modelos experimentales que permiten la maduración de queratinocitos y reproducen las propiedades de crecimiento del epitelio escamoso⁵⁷, ratones transgénicos⁶², etc. Recientemente, se ha descrito un modelo experimental para producir infecciones productivas en ratones desnudos⁶³.

En la actualidad, la infección genital por HPV es una de las enfermedades de transmisión sexual más frecuente y su incidencia tiene un incremento progresivo, relacionado probablemente con los cambios sufridos en las costumbres sexuales, hasta el punto de que existe un reconocimiento unánime internacional de que estamos ante un desarrollo epidémico de esta enfermedad.

En Inglaterra, un informe del Departamento de Salud y Seguridad Social⁶⁴ señala un incremento del 250% en la incidencia de condiloma acuminado entre 1979 y 1982. En Australia, Evans y Dowling⁶⁵ refieren un aumento de esta misma patología desde el 0.58% en 1979 al 5.6% en 1988. Becker⁶⁶ encuentra una incidencia de infección por HPV en América Latina del 9%.

En España los datos sobre esta infección son escasos. Matorras⁶⁷ apunta una prevalencia del 1-2% y Cancelo⁶⁸ del 2.5%.

Esta enfermedad representa un grave problema sanitario debido a la transformación maligna que experimentan algunas lesiones derivadas de la infección por HPV. Por este motivo, una parte importante de las investigaciones están encaminadas al desarrollo de técnicas diagnósticas sencillas, que puedan usarse rutinariamente y que permitan la detección precoz de la infección, y a la búsqueda de parámetros clínicos y biológicos que aporten una orientación pronóstica sobre la evolución de una lesión.

I.2. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.

I.2.1. TAXONOMIA.

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus, en su quinto informe⁶⁹, incluye el HPV entre los virus de vertebrados con ADN bicatenario circular, sin envuelta, familia *Papoviridae* (tabla I.I), género *Papillomavirus*⁶⁹. La especie tipo del género es el virus del papiloma del conejo.

Las características principales del género se resumen a continuación^{69,70}:

- Peso molecular del ADN: 5×10^6 dalton.
- Contenido en G+C: 40-50%.
- Diámetro de la cápside: 50-55 nm.
- Densidad de flotación en CsCl: 1.34 g/cm^3 .
- Resistentes a éter, ácido y calor.
- No se conoce sistema celular de cultivo *in vitro*.
- Cada especie contiene un antígeno de superficie distinto, pero todos los miembros del género poseen un antígeno común que se demuestra en viriones rotos.
- Pueden transmitirse mecánicamente por artrópodos.

FAMILIA	GENERO	ESPECIE
Papovaviridae	Papillomavirus	Virus del papiloma del conejo *
		Virus del papiloma humano
		Virus del papiloma del ciervo
		Virus del papiloma del perro
		Virus del papiloma del caballo
		Virus del papiloma de la rata
		Virus del papiloma de la cabra
	Virus del papiloma de la oveja	
	Polyomavirus	Virus del polioma del ratón *
		BK y JC (humanos)
		K (ratón)
		RKV (conejo)
		HaPV (hámster)
		SV40 (mono rhesus)
STMV (macaco de cola)		
LPV (mono verde)		
SA12 (babuino)		

Tabla 1.1. Estructura de la familia *Papovaviridae*. Las especies marcadas con asterisco son las especies tipo de cada género.

1.2.2. CLASIFICACION.

Los virus del papiloma se clasifican según su huésped natural y según la homología de secuencia de su ADN. Así, cada virus se nombra con las siglas PV (de la terminología inglesa "papillomavirus") precedida de la inicial del nombre en inglés de la especie que infecta. Por ejemplo, HPV ("human papillomavirus") para el virus del papiloma humano, BPV ("bovine papillomavirus") para el virus del papiloma bovino, DPV ("deer papillomavirus") para el virus del papiloma del ciervo, etc.

Los virus del papiloma aislados de una misma especie se clasifican en tipos en virtud de la homología en su secuencia de nucleótidos⁷¹ y se numeran correlativamente (por ejemplo, HPV 1, HPV 2, etc.). Para esta clasificación no es posible utilizar criterios serológicos porque no se dispone de anticuerpos

específicos de la mayoría de los tipos de virus. En consecuencia, para establecer la identidad de un nuevo aislado se lleva a cabo el siguiente procedimiento⁷²:

1. El ADN de HPV recién aislado se hibrida en solución en condiciones estrictas con una panel de ADN marcado isotópicamente correspondiente a tipos conocidos de HPV.
2. Las mezclas de reacción se tratan a continuación con nucleasa S1, que digiere el ADN monocatenario.
3. Se mide el porcentaje de ADN radiomarcado, que corresponde al ADN de cada tipo conocido de HPV que ha hibridado con el ADN del HPV en estudio y que, por lo tanto, habrá quedado protegido de la acción de la nucleasa S1.

Por definición, un ADN vírico que muestre menos del 50% de homología con el resto de los tipos de HPV conocidos se considera un nuevo tipo y se le asigna el número que le corresponda por orden de descubrimiento. Un ADN que presente un grado de homología comprendido entre el 50 y el 100% con un tipo conocido de HPV se considera un subtipo de aquél y se designa con el mismo número y la letra minúscula que le corresponda (por ejemplo, HPV 6a, HPV 6b, etc.). Un ADN que presente un grado de homología prácticamente del 100% con un tipo conocido de HPV se considera una variante del mismo tipo viral^{48,72}.

I.2.3. ESTRUCTURA DEL VIRION.

El virión del HPV está constituido por un núcleo central de ADN encerrado dentro de una cápside proteica constituida por 72 subunidades o capsómeros, dispuestos según una simetría icosaédrica, que le confiere una forma prácticamente esférica cuando se observa con microscopía electrónica⁷³. El virión maduro carece de envuelta externa.

El análisis bioquímico revela que la partícula carece de lípidos y carbohidratos, y contiene varias proteínas con pesos moleculares que oscilan entre 10 y 76×10^3 dalton. Las proteínas de bajo peso molecular corresponden a histonas procedentes de la célula huésped, y las de alto peso molecular corresponden a proteínas estructurales del virus.

La cápside viral está constituida por dos proteínas estructurales diferentes: una proteína principal, con un peso molecular de 54.000 dalton, y una proteína secundaria, con un peso molecular de 76.000 dalton⁷³. Los antisueros obtenidos contra la proteína principal desnaturalizada dan reacción cruzada con todos los virus del papiloma, tanto humanos como animales, por lo que se considera un antígeno específico de género^{43,74}. Por el contrario, la proteína secundaria es altamente específica de tipo y puede ser utilizada en el futuro como diana para el tipado inmunohistoquímico de las infecciones producidas por HPV⁷³.

I.2.4. ORGANIZACION DEL GENOMA.

El genoma de los virus del papiloma está constituido por una molécula de ADN circular, bicatenaria, de una longitud aproximada de 8.000 pares de bases y un peso molecular de 5.2×10^6 dalton⁷³.

El ADN está combinado con histonas procedentes de la célula huésped y condensado en nucleosomas⁷⁵. Si se eliminan las histonas, el ADN adquiere una estructura superenrollada (forma I). La rotura de una de las cadenas mediante endonucleasas de restricción origina un círculo relajado (forma II) y la rotura de ambas cadenas por el mismo sitio origina una molécula lineal (forma III). Estas tres formas de ADN viral pueden ser detectadas electroforéticamente por su distinta movilidad^{45,76}.

El análisis de la secuencia de ADN de varios tipos de virus del papiloma, animales y humanos, demuestra que, a pesar de las grandes variaciones en

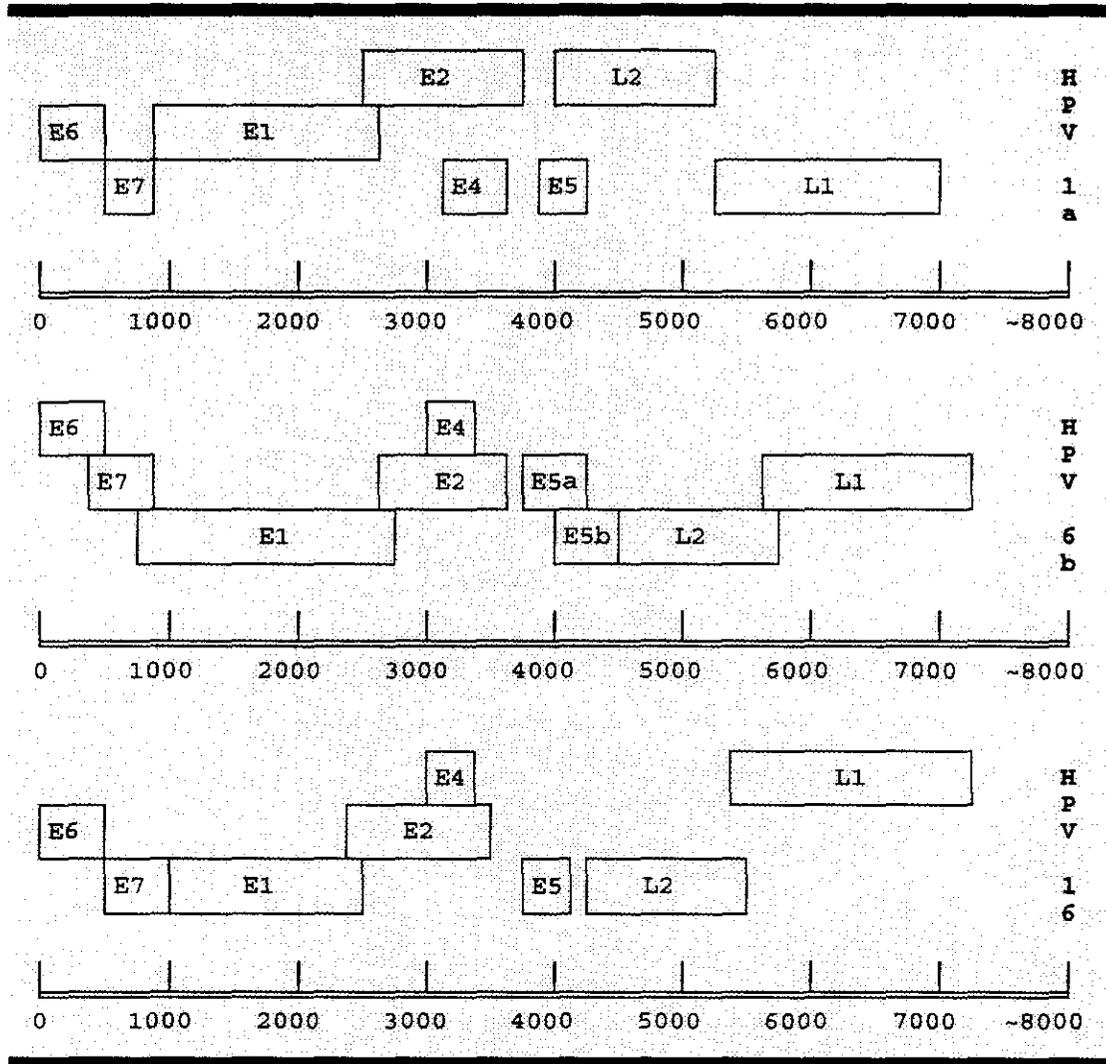


Figura I.2. Comparación de la organización genómica de varios HPV. (Adaptado de referencias 89 y 93).

homología, la organización genómica está muy conservada en estos virus⁷⁷⁻⁸⁰ (Fig. I.2).

Funcionalmente, el genoma de estos virus está dividido en tres regiones^{48,81,82} (tabla I.II):

1. Región temprana o región E (del término inglés "early"), que representa alrededor del 45% del genoma y contiene 8 unidades potenciales de transcripción (ORF, de la terminología inglesa "open reading frames"), que codifican para proteínas con función reguladora (E1 y E2)^{45,83-85},

REGION	ORF	FUNCION
E	E1	Regulación de la replicación viral; conservación del episoma.
	E2	Regulación de la transcripción; codifica una proteína que se une a DNA.
	E3	Desconocida.
	E4	Codifica una proteína citoplásmica con una posible función en la maduración viral.
	E5	Transformación celular; control del número de copias en forma episómica.
	E6	Transformación celular; control del número de copias en forma episómica.
	E7	Inmortalización celular; activador de la transcripción.
	E8	Posible función en la replicación viral.
L	L1	Codifica para la proteína principal de la cápside.
	L2	Codifica para la proteína secundaria de la cápside.

Tabla I.II. Resumen de la organización genómica de PV, con indicación de las regiones en que se divide el genoma, unidades potenciales de transcripción y sus correspondientes funciones.

con actividad transformante potencial (E5, E6 y E7)⁸⁶⁻⁹³ o de función desconocida (E3, E4 y E8).

- Región tardía o región L (del término inglés "late"), que representa alrededor del 40% del genoma y contiene dos ORF: L1, que codifica para la proteína estructural principal de la cápside, y L2, que codifica para la proteína estructural secundaria de la cápside^{45,94}.
- Región reguladora ascendente (URR, de la terminología inglesa "upstream regulatory region"), comprendida entre el extremo 3' del ORF L1 y el extremo 5' del ORF E6, sin función codificante, pero que contiene elementos reguladores. Se la denomina también región control

larga (LCR, de la terminología inglesa "long control region") y región no codificante (NCR, de la terminología inglesa "non-coding region"). Esta región contiene un origen de replicación; dos orígenes de transcripción; elementos promotores para ADN polimerasa II, incluyendo secuencias TATA y CAAT; y un dominio rico en GT con una señal de poliadenilación para transcritos de la región L^{95,96}.

I.2.5. BIOLOGIA VIRAL.

Todo el epitelio escamoso del tracto genital es susceptible de infección por HPV. Sin embargo, la zona más vulnerable es la unión escamo-columnar, en particular las zonas de metaplasia escamosa³². No se conoce todavía con exactitud cómo se produce la infección, aunque se piensa que ésta se inicia en las células replicativas de la capa basal del epitelio y que el virus alcanza estas células a través de defectos en la mucosa superficial (erosiones, microlesiones, cervicitis, etc.). Esta hipótesis se apoya en dos hallazgos⁹⁶:

- Se ha demostrado la presencia de ADN y ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de HPV en células basales de tejidos infectados.
- La infección experimental de epitelio escamoso por HPV se potencia alterando la superficie epitelial antes de la exposición al virus.

Aunque las células epiteliales escamosas parecen ser la diana principal de HPV, hay también pruebas a favor de que la infección puede ocurrir en las células epiteliales de reserva indiferenciadas que darán origen al componente escamoso y glandular de la mucosa cervical. Esto explicaría la presencia de HPV en adenocarcinomas y carcinomas de células pequeñas indiferenciadas⁹⁷⁻⁹⁹.

El hecho de que ciertos tipos de HPV genitales no se observen en otras localizaciones extragenitales parece indicar que estos tipos virales requieren

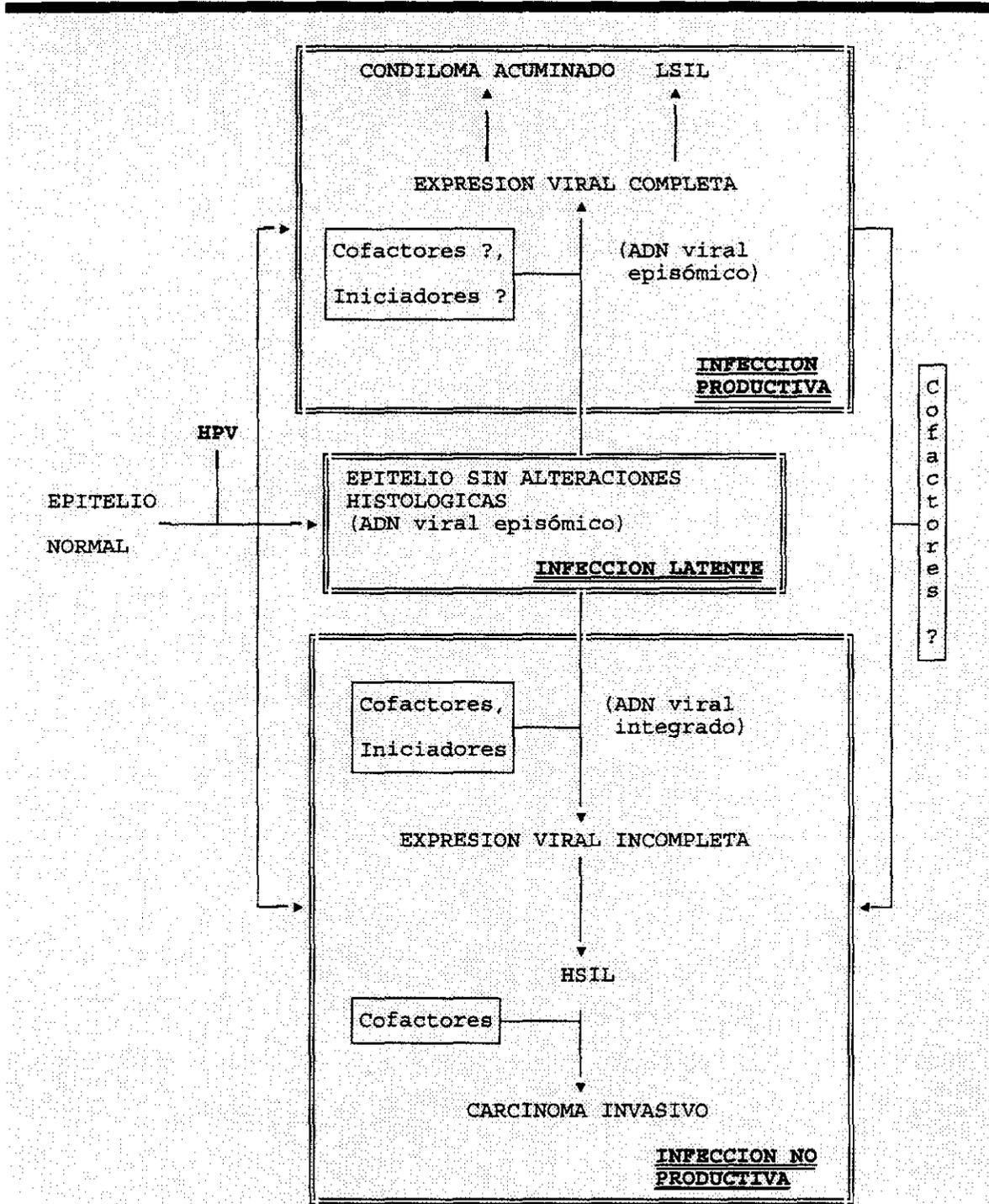
características específicas del epitelio diana para que la infección se produzca. Esto hace pensar en la posible existencia de receptores específicos en este epitelio para estos virus y/o un microambiente especial que favorecería la infección por determinados tipos de HPV⁹⁶. El mecanismo de infección implicaría la unión del virus a la superficie de la célula diana, con gran probabilidad a nivel de receptores de membrana específicos, la internalización del virus en la célula, la apertura de la cápside y la liberación del ADN vírico en el núcleo de la célula infectada en forma de episoma^{96,100}. A partir de este momento, y dependiendo de varios factores, se pueden producir tres tipos de infección: latente, productiva y no productiva (figura 1.3).

1.2.5.1. Infección latente.

Desde que se produce la infección genital por un tipo de HPV hasta que se desarrolla una lesión pasa un período de tiempo que varía desde unas pocas semanas a varios meses e incluso años^{63,101}. Esto permite definir la infección latente como la presencia de ADN de HPV en células de un epitelio sin alteraciones clínicas ni histológicas detectables.

Se ha demostrado la presencia de ADN de HPV en epitelio genital normal de pacientes con historia de condilomas de repetición¹⁰², y en zonas de epitelio histológicamente normales cercanas a carcinomas genitales asociados a HPV^{103,104}. Sin embargo, dado que en todos estos casos los pacientes presentaban o habían presentado lesiones asociadas a HPV, la presencia de ADN viral en zonas de epitelio normal puede ser debida a contaminación por material celular de la zona infectada o a una extensión del virus desde las zonas morfológicamente anormales a las adyacentes.

Estudios posteriores demostraron la existencia de ADN de HPV en epitelio cervical normal de pacientes que no tenían historia previa de lesiones asociadas a HPV¹⁰⁵⁻¹¹⁶. En estos trabajos el porcentaje de pacientes con infección latente



LSIL = Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado.
HSIL = Lesión intraepitelial escamosa de alto grado.

Figura 1.3. Esquema de los posibles tipos de infección genital por HPV.

5306062185

varía desde el 4.5%¹⁰⁹ al 29%¹⁰⁷, con un valor medio alrededor del 10%. El ADN viral presente en este tejido normal es episómico y hasta el momento no se ha estudiado el nivel de expresión del genoma vírico en este tipo de infección.

Tampoco está claro si la ausencia de lesiones durante un período largo de tiempo es debido a bajo potencial patogénico de los virus que producen este tipo de infección o a factores inmunológicos del paciente.

I.2.5.2. Infección productiva.

La infección productiva por HPV se caracteriza por tres hechos:

1. Mantenimiento del genoma vírico en forma episómica.
2. Expresión completa del genoma vírico.
3. Producción de nuevas partículas víricas.

La expresión del genoma vírico comienza por los genes de la región temprana, sintetizándose proteínas reguladoras que a nivel celular determinan una mayor proliferación de las células infectadas, y a nivel del ADN vírico potencian la replicación viral, con aumento del número de copias del genoma vírico en forma episómica. Histológicamente, esto se traduce en hiperplasia de las células basales y acantosis^{117,118}.

A continuación se expresan los genes de la región tardía, y se sintetizan las proteínas de la cápside. Al final se produce el ensamblaje de los nuevos viriones, que pueden ser detectados por microscopía electrónica e inmunohistoquímica^{44,46,119}.

El proceso de maduración viral está íntimamente ligado al proceso de

maduración epitelial. De hecho, el ensamblaje de los viriones se produce sólo en células epiteliales escamosas diferenciadas del tercio superior del epitelio^{44,120}. Durante el tránsito de la capa basal a la superficie, la célula escamosa sufre una serie de cambios complejos, incluido la producción de citoqueratinas⁶³, que determinan la aparición de un microambiente intracelular adecuado para la producción de nuevas partículas víricas³⁷.

La expresión de la región tardía del genoma de HPV se manifiesta histológicamente por cambios degenerativos en las células escamosas diferenciadas. La alteración celular más representativa de la infección productiva es la coilocitosis, descrita por primera vez por Koss y Durfee en 1956²⁸, caracterizada por vacualización citoplásmica perinuclear y picnosis o hiperchromatosis nuclear. Este fenómeno parece estar relacionado con la expresión de la proteína viral E4, que desorganiza la matriz intracelular de citoqueratinas para facilitar la liberación de partículas víricas¹²¹. Otras alteraciones histológicas incluyen paraqueratosis e hiperqueratosis, papilomatosis, binucleación, anisonucleosis y cromatina con aspecto de vidrio esmerilado¹¹⁸. El resultado histológico final suele ser lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL, de la terminología inglesa "low-grade squamous intraepithelial lesion"), que en un porcentaje mayoritario persisten o regresan, dependiendo de la respuesta inmune del paciente, y muy raras veces progresan hacia lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL, de la terminología inglesa "high-grade squamous intraepithelial lesion") y carcinomas invasivos¹¹⁷.

1.2.5.3. Infección no productiva.

La infección no productiva presenta tres características principales:

1. Expresión incompleta del genoma vírico.
2. No producción de nuevos viriones.

3. Integración del ADN vírico en el genoma de la célula infectada, en la mayoría de los casos¹²².

Hasta el momento no se ha descrito ningún sitio específico de integración del ADN de HPV en el ADN celular. Por el contrario, el genoma vírico sí presenta una región específica en la que se produce la apertura de la molécula circular de ADN en el proceso de integración. Concretamente ésta tiene lugar en el extremo 3' del ORF E1 o en el extremo 5' del ORF E2, lo que determina la pérdida de las funciones de transactivación y regulación de la transcripción codificada por el ORF E2^{82,83,87,89,123-126}. Esto implica la no expresión de la región tardía y la sobreexpresión de los dominios E6 y E7, con capacidad potencial transformante. Todo esto se traduce histológicamente en la proliferación de las células infectadas con pérdida de la maduración, dando lugar a HSIL, caracterizadas por la presencia de células inmaduras con signos de atipia nuclear ocupando más de un tercio del grosor del epitelio^{96,117,118}. Estas lesiones, dependiendo de varios cofactores y de la respuesta inmune del paciente, pueden persistir, regresar o, en un porcentaje elevado de casos, progresar a carcinoma invasivo¹¹⁷.

I.3. LESIONES GENITALES ASOCIADAS A HPV.

El desarrollo de las técnicas de biología molecular ha puesto de manifiesto la asociación de HPV con un amplio espectro de manifestaciones clínicas en el tracto genital femenino inferior, que abarcan desde lesiones benignas (condilomas)^{44,119,127-133} hasta lesiones malignas (carcinomas)^{97,113,128,134-149}, pasando por un abanico de lesiones no invasivas con potencialidad de evolución maligna^{44,109,136,149-161}. La terminología clásica separa éstas últimas en dos grupos¹⁶²⁻¹⁶⁴: displasia y carcinoma in situ (CIS). Posteriormente, han surgido otras dos terminologías para las lesiones no invasivas: neoplasia intraepitelial¹⁶⁵ y lesión intraepitelial escamosa^{166,167}. A continuación se desarrollan brevemente estas tres clasificaciones, así como las características histopatológicas de las distintas lesiones genitales asociadas a HPV, con especial atención a las lesiones

de cérvix, por ser éstas las más estudiadas y las más representativas.

I.3.1. CONDILOMA.

El condiloma es la manifestación más frecuente de la infección genital por HPV. Consiste en una lesión hiperplásica benigna cuyo aspecto macroscópico varía, dependiendo fundamentalmente del tipo y localización del epitelio infectado y del tipo de HPV que produce la infección. Así, en epitelio cutáneo (vulva y región perianal) el condiloma típico es una lesión exofítica, de aspecto polipoide, que suele estar queratinizada, y que se denomina condiloma acuminado (fig. I.4); en epitelio mucoso (vagina y cérvix), por el contrario, los condilomas más frecuentes tienen aspecto plano, un poco sobreelevados, formando placas irregulares con una superficie ligeramente ondulada o espiculada, normalmente poco queratinizados, y se denominan condilomas planos¹¹⁷. En muchas ocasiones éste último tipo de lesión sólo es visible mediante colposcopia, tras aplicación de ácido acético al 5%, con lo que adquieren un color blanquecino (fig. I.5).



Figura I.4. Condilomas acuminados múltiples en vulva y región perineal.

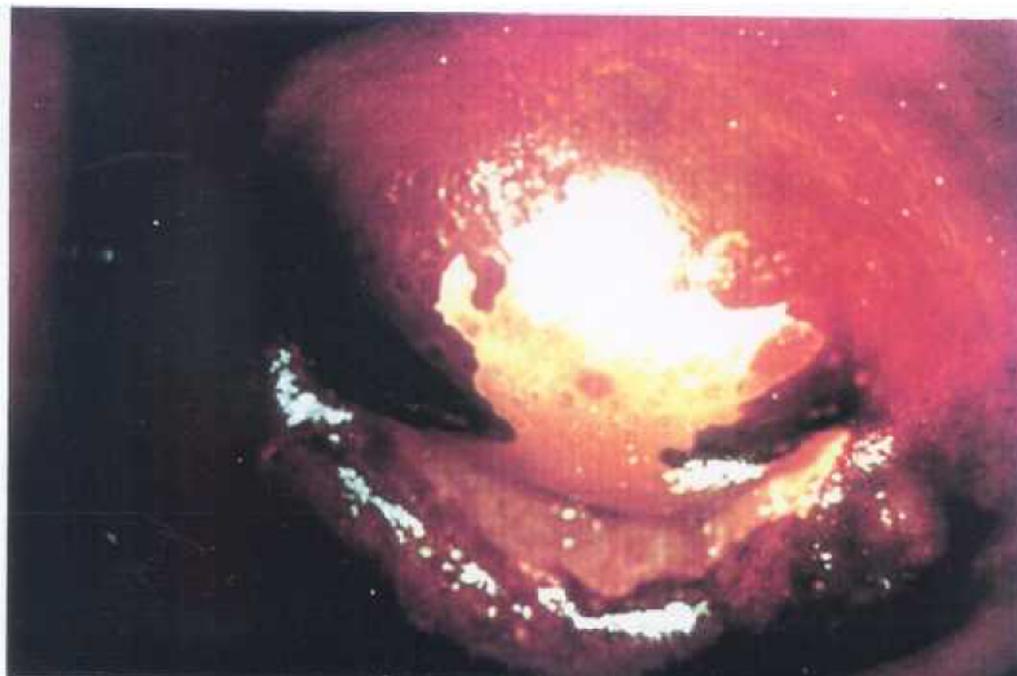


Figura 1.5. Imagen coloscópica de cérvix en la que se observa un área blanquecina de límites irregulares tras la aplicación de ácido acético al 5%.

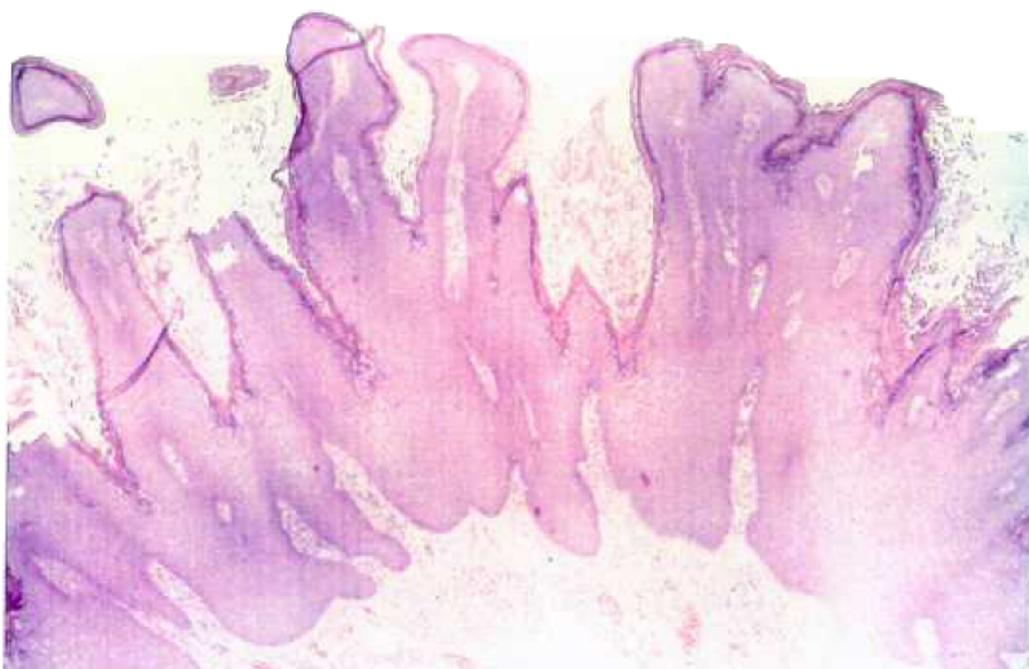


Figura 1.6. Microfotografía correspondiente a un condiloma acuminado de vulva, en la que se aprecian las alteraciones características de esta lesión. (Hematoxilina-eosina, x 40).



Figura I.7. Condiloma plano de cérvix. (Hematoxilina-eosina, x 100).

Histológicamente, los condilomas presentan las siguientes características^{34,35,117} (figs. I.6 y I.7):

- Papilomatosis.
- Acanthosis.
- Paraqueratosis e hiperqueratosis.
- Hiperplasia de células basales.
- Coilocitosis.
- Binucleación.
- Anisonucleosis, picnosis e hiper cromatismo nuclear.

- Núcleos con aspecto de vidrio esmerilado.
- Figuras de mitosis en el tercio inferior del epitelio.

I.3.2. LESIONES NO INVASIVAS CON POTENCIALIDAD DE EVOLUCION MALIGNA.

I.3.2.1. Terminología clásica.

La terminología clásica, se basa en criterios puramente histológicos, sin tener en cuenta ninguna consideración clínica ni terapéutica, y separa las lesiones no invasivas en dos grupos: displasia y carcinoma *in situ*.

Las lesiones displásicas fueron caracterizadas por Reagan en 1953¹⁶² como la proliferación de células atípicas sin ocupar el grosor entero del epitelio. Estas células atípicas son habitualmente células basales indiferenciadas que maduran cerca de la superficie.

En 1961, en el 1^{er} Congreso Internacional de Citología Exfoliativa, el Comité de Terminología Histológica para Lesiones de Cérvix Uterino¹⁶⁴ definió el carcinoma *in situ* como una lesión en la que, en ausencia de invasión, el grosor entero del epitelio está ocupado por células indiferenciadas. Cualquier otra alteración de la diferenciación del epitelio escamoso se definió como displasia.

Histológicamente, las lesiones displásicas presentan atipia nuclear, caracterizada por:

- Hiper Cromatismo.
- Bordes nucleares irregulares.

- Distribución anormal de la cromatina.
- Cromatina granular (en forma de sal y pimienta).
- Incremento de la relación núcleo/citoplasma.
- Aumento de la actividad mitótica con algunas mitosis atípicas.

Las alteraciones nucleares se encuentran en todas las capas del epitelio, independientemente del grado de maduración citoplásmica.

La gradación de las lesiones displásicas se basa en la proporción de epitelio ocupado por células indiferenciadas, lo que refleja una pérdida progresiva de maduración epitelial a medida que aumenta la severidad de la lesión. Se distinguen tres grados de displasia:

1. **Displasia leve:** las células indiferenciadas ocupan el tercio inferior del epitelio (fig. I.8).
2. **Displasia moderada:** la proliferación de células indiferenciadas se extiende entre el tercio inferior y el tercio medio del epitelio, sin sobrepasar éste último (fig. I.9).
3. **Displasia severa:** las células indiferenciadas ocupan más de dos tercios del epitelio, sin llegar a ocupar el grosor entero del mismo (fig. I.10).

Cuando todo el espesor del epitelio está ocupado por células indiferenciadas semejantes a las basales y con alto grado de atipia, la lesión se diagnostica de carcinoma *in situ* (fig. I.11).

Esta terminología se usa tanto en lesiones de cérvix como en lesiones de vulva y vagina y ha sido adoptada por la Organización Mundial de la Salud¹⁶³.

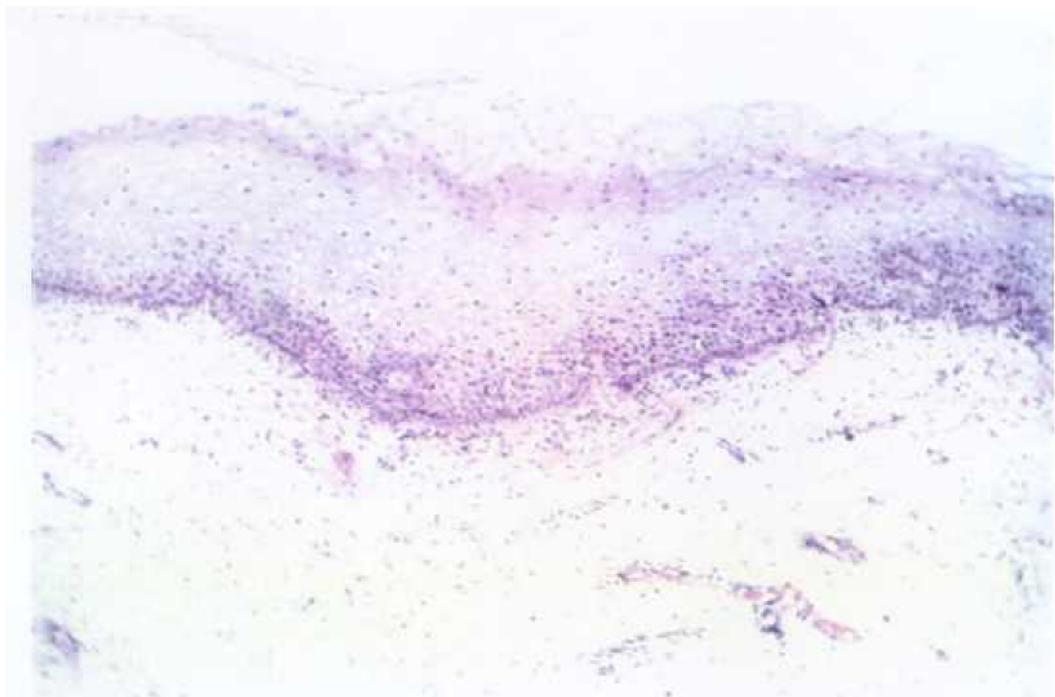


Figura 1.8. Biopsia cervical diagnosticada de LSIL (displasia leve/CIN I) compatible con infección por HPV. (Hematoxilina-eosina, x 100).

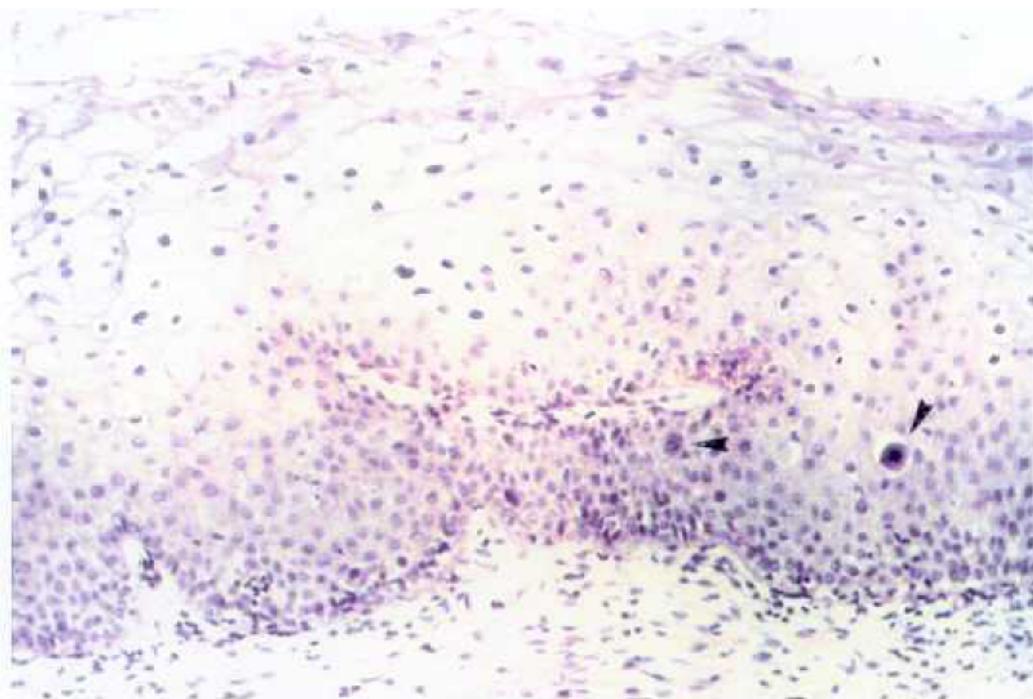


Figura 1.9. Biopsia cervical diagnosticada de HSIL (displasia moderada/CIN II) compatible con infección por HPV, en la que se aprecia proliferación de la capa basal, que alcanza el tercio medio del epitelio, y atipia celular en estratos profundos (flechas). (Hematoxilina-eosina, x 200).

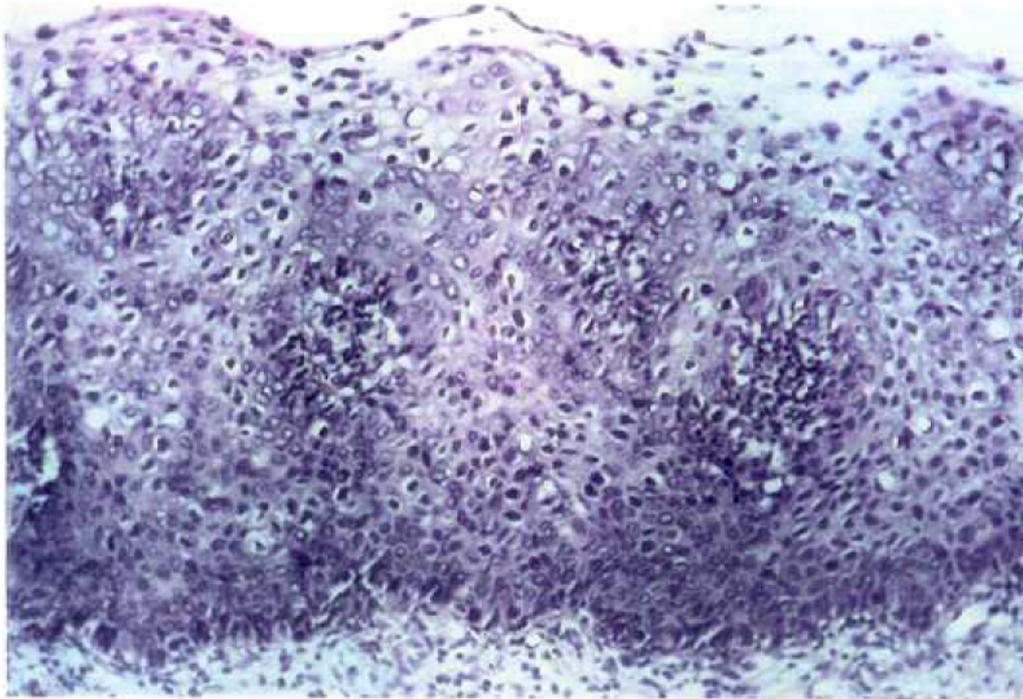


Figura I.10. Mucosa cervical con diagnóstico de HSIL (displasia severa/CIN III) con alteraciones en la maduración del epitelio, atipia celular y elevado índice mitótico. (Hematoxilina-eosina, x 200).

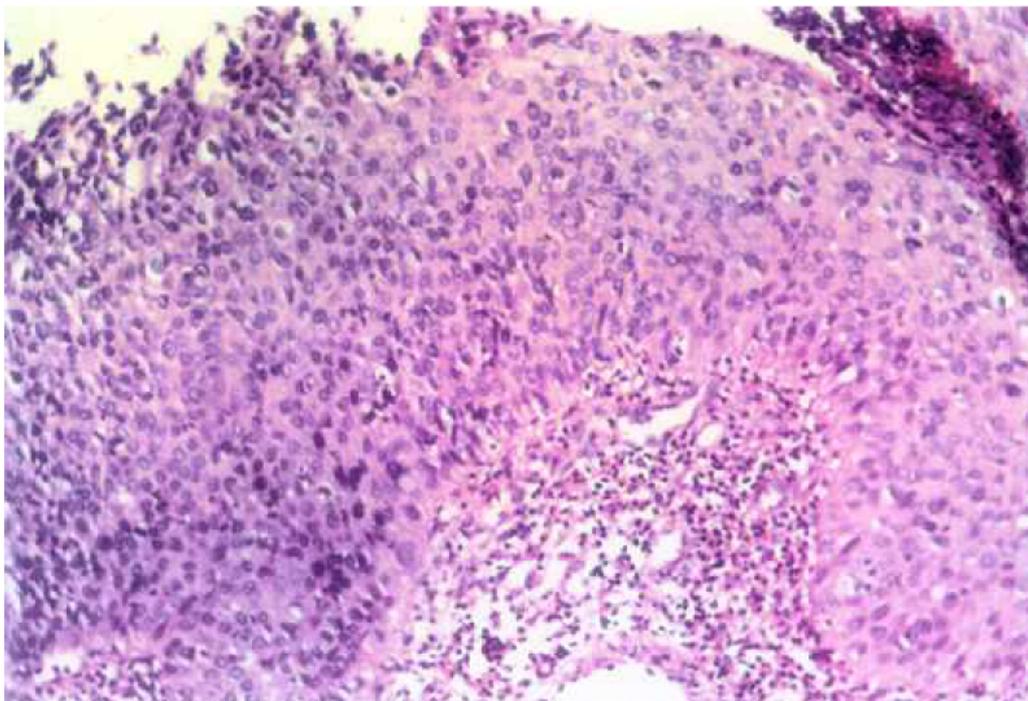


Figura I.11. Biopsia de cérvix uterino diagnosticada de HSIL (CIN III/Carcinoma *in situ*) con alto grado de atipia celular en todas las capas del epitelio, permaneciendo intacta la membrana basal. (Hematoxilina-eosina, x 200).

I.3.2.2. Clasificación CIN.

A finales de los años 60, y de la observación en lesiones displásicas de cérvix uterino de toda una gradación en la diferenciación y maduración celular, surgió la idea de que todas estas lesiones eran distintas manifestaciones de un único proceso patológico, que se denominó neoplasia intraepitelial cervical^{165,168} (CIN, de la terminología inglesa "cervical intraepithelial neoplasia").

El uso de este término, aplicado a una lesión, implica una potencialidad de evolución maligna, es decir, que esa lesión, si no se trata, tiene una probabilidad significativa de progresar a carcinoma invasivo en algún momento en el futuro^{169,170}.

Las características histológicas y colposcópicas del CIN son las mismas que las de la displasia y, como ésta, se subdivide en tres grados dependiendo también del grosor del epitelio ocupado por células indiferenciadas semejantes a las basales:

1. **CIN I**, equivalente a la displasia leve (fig. I.8).
2. **CIN II**, equivalente a la displasia moderada (fig. I.9).
3. **CIN III**, que elimina la distinción morfológica entre displasia severa y carcinoma *in situ*, sin ninguna significación clínica, y las agrupa en una sola categoría (figs. I.10 y I.11) (tabla I.III).

Este mismo sistema de clasificación se aplica también a las lesiones premalignas no invasivas de vulva (VIN, de la terminología inglesa "vulvar intraepithelial neoplasia") y de vagina (VaIN, de la terminología inglesa "vaginal intraepithelial neoplasia")⁹⁶.

SISTEMA CLASICO	SISTEMA CIN	SISTEMA DE BETHESDA
displasia leve	CIN I	LSIL
displasia moderada	CIN II	HSIL
displasia severa	CIN III	
carcinoma <i>in situ</i>		

Tabla I.III. Equivalencias entre las distintas clasificaciones de las lesiones de cérvix uterino con potencialidad de evolución maligna.

I.3.2.3. Sistema de Bethesda.

En 1988, en una reunión en el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos, en Bethesda, se propuso una nueva terminología para las lesiones cervicales diagnosticadas mediante citología exfoliativa¹⁶⁶, que fue modificada en 1991¹⁶⁷.

Según este sistema, las citologías que muestran cambios asociados a HPV (coilocitosis y anisocitosis), así como las formas de displasia leve, se clasifican como lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL). Las formas de displasia moderada, displasia severa y CIS se clasifican como lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL).

Aunque esta clasificación fue diseñada en principio para informes citológicos, se ha extendido también a los informes histopatológicos^{96,171}, manteniendo las correspondencias con las otras clasificaciones (tabla I.III).

La aplicación del sistema de Bethesda al diagnóstico histopatológico de

biopsias cervicales se basa en criterios de distribución de la atipia celular más que en criterios de maduración, en los que se basan el sistema clásico y el sistema CIN⁹⁶. Conviene interpretar estas lesiones como el resultado de la interacción virus-huésped, que origina una transformación morfológica del epitelio. En las LSIL este proceso produce una lesión en la que las principales anormalidades citológicas se observan en la superficie del epitelio y se caracterizan por coilocitosis, disqueratosis, anisonucleosis e hiper cromatismo nuclear⁹⁶ (figs. I.7 y I.8). Por lo tanto, en esta categoría se engloban los condilomas acuminado y plano y el CIN I/displasia leve. En las HSIL la alteración del epitelio es mayor y se caracteriza por atipia nuclear que afecta a casi todas o todas las capas celulares de por lo menos una porción de la lesión. Concretamente, se observa un alto índice mitótico, con mitosis incluso en capas celulares superficiales y figuras de mitosis anormales, pérdida de la polaridad celular, anisonucleosis e hiper cromatismo nuclear en capas de células parabasales⁹⁶ (figs. I.9, I.10 y I.11). En esta categoría se engloban el CIN II/displasia moderada y el CIN III/displasia severa-carcinoma *in situ*.

Dos son las ventajas que presenta este sistema de clasificación sobre los anteriores:

1. La agrupación de las lesiones cervicales en dos categorías, LSIL y HSIL, tiene una mayor significación cuando se consideran criterios terapéuticos.
2. La agrupación de CIN II (displasia moderada) y CIN III (displasia severa y CIS) en una única categoría, ya que, si bien hay diferencia histológica entre ambos grados de CIN, la diferencia es muy pequeña cuando se evalúan parámetros virales o de contenido de ADN celular^{136,157,169,172-174}.

El principal problema de este sistema es determinar el límite entre LSIL y HSIL. Sin embargo, este problema se plantea en todas las clasificaciones cuando hay que determinar los límites entre cada grado histológico de una lesión

(displasia o CIN). Además, a nivel de tratamiento, la importancia de diagnosticar una lesión dudosa como LSIL o HSIL se reduce teniendo en cuenta que los resultados anatomopatológicos deben completarse siempre con parámetros clínicos y colposcópicos.

Hasta el momento actual, la clasificación de Bethesda se aplica sólo a lesiones cervicales, manteniéndose la terminología de neoplasia intraepitelial para las lesiones vulvares y vaginales (VIN y VaIN, respectivamente).

I.3.3. LESIONES INVASIVAS.

Varios tipos de carcinoma genital se han asociado con la presencia de ADN de HPV, principalmente de los tipos 16 y 18, incluyendo carcinomas escamosos de cérvix, carcinomas verrucosos, carcinomas de células pequeñas y adenocarcinomas de cérvix.

I.3.3.1. Carcinoma escamoso de cérvix.

La mayoría de los carcinomas escamosos de cérvix evolucionan desde una lesión precancerosa (HSIL)¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ y se localizan mayoritariamente en la zona de transformación. Su apariencia macroscópica depende fundamentalmente del tiempo de evolución. Las lesiones tempranas pueden producir induración focal, ulceraciones poco profundas o áreas granulares ligeramente sobreelevadas que sangran fácilmente al tocarlas. Las lesiones más avanzadas pueden tener apariencia endofítica (ulceroinvasiva o nóduloinvasiva) o exofítica (polipoide o papilar).

Microscópicamente se caracterizan por cordones o masas sólidas de epitelio neoplásico, de contorno irregular, que infiltran el estroma fibroso del cérvix. La clasificación histológica más ampliamente aceptada es una modificación

del sistema de Broder y se basa en el grado de diferenciación de las células neoplásicas^{178,179}.

1. **Carcinoma escamoso bien diferenciado.** Su característica más relevante es la abundante formación de queratina, que se deposita en círculos concéntricos en el centro de las masas epiteliales neoplásicas, formando los llamados globos córneos (Fig. I.12).

Las células aparecen maduras, con citoplasmas voluminosos y eosinófilos. A veces presentan un aspecto claro por la acumulación de glucógeno intracitoplásmico. Los núcleos son grandes, irregulares o hipercromáticos, con nucleolos aumentados en número y tamaño. Se observan mitosis, sobre todo en la periferia de las masas epiteliales en crecimiento. En el estroma a menudo se observa un infiltrado de células inflamatorias crónicas y a veces se observan también reacciones de cuerpo extraño.

2. **Carcinoma escamoso moderadamente diferenciado.** Las células son más pleomórficas que en el caso anterior y se caracterizan por tener núcleos grandes irregulares y citoplasma menos abundante. Prácticamente no hay formación de globos córneos, pero en el centro de las masas tumorales se observa disqueratosis (Fig. I.13). Las figuras de mitosis son más numerosas que en el carcinoma bien diferenciado.
3. **Carcinoma escamoso pobremente diferenciado.** Generalmente está constituido por células con núcleos ovals hipercromáticos y citoplasma escaso, recordando las células basales de las HSIL (Fig. I.14). Se observan escasos focos de disqueratosis y abundantes mitosis y zonas de necrosis. A veces, este tipo de carcinomas está compuesto por células pleomórficas grandes, de núcleos gigantes, observándose mitosis anormales. En raras ocasiones las células neoplásicas tienen forma fusiforme, recordando un sarcoma.

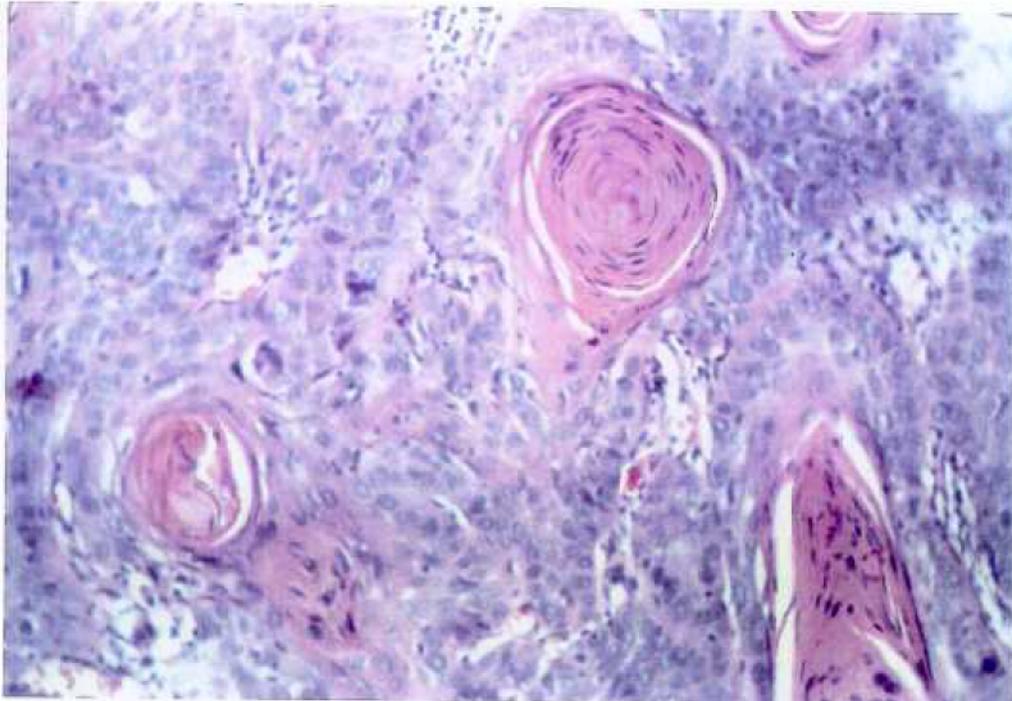


Figura I.12. Carcinoma escamoso de cérvix bien diferenciado. Obsérvese la formación de globos córneos (flechas). (Hematoxilina-eosina, x 200).

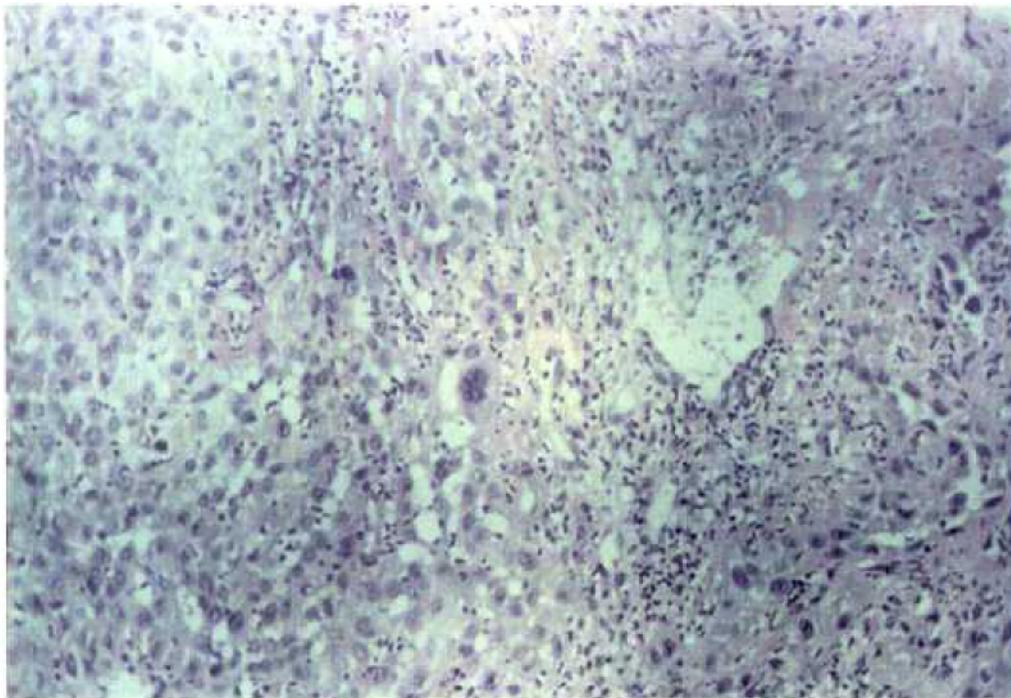


Figura I.13. Carcinoma escamoso de cérvix moderadamente diferenciado. (Hematoxilina-eosina, x 200).

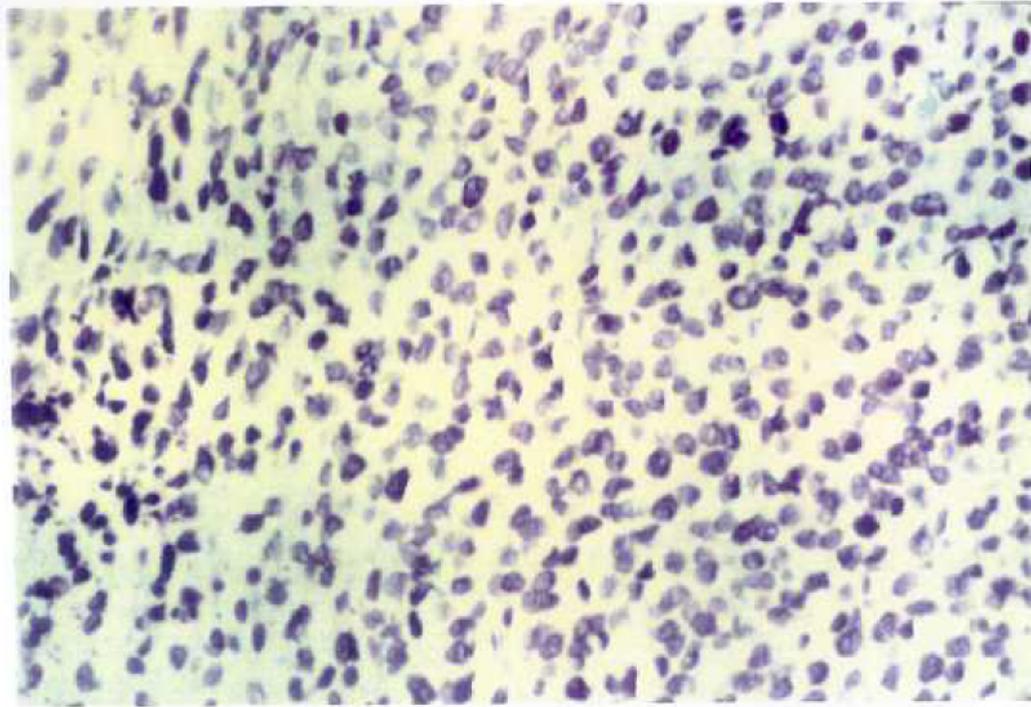


Figura I.14. Carcinoma indiferenciado de cérvix. (Hematoxilín-eosina, x 320).

I.3.3.2. Carcinoma verrucoso.

El carcinoma verrucoso se puede considerar una variante rara del carcinoma escamoso bien diferenciado. Se observan más comúnmente en vulva que en cérvix^{180,181}. Macroscópicamente son lesiones grandes, sésiles, que recuerdan a los condilomas. Histológicamente consisten en epitelio de apariencia hiperplásica, con proyecciones papilares sin núcleo central fibrovascular y con cordones de células escamosas bien diferenciadas que se expanden en el estroma subyacente (fig. I.15). El extremo de estos cordones de invasión puede ser romo o anguloso y carece de atipia nuclear significativa, aunque en algunos casos se pueden observar numerosas mitosis. Normalmente, un intenso infiltrado inflamatorio se asocia a este tipo de carcinoma, aun sin ser específico de él.

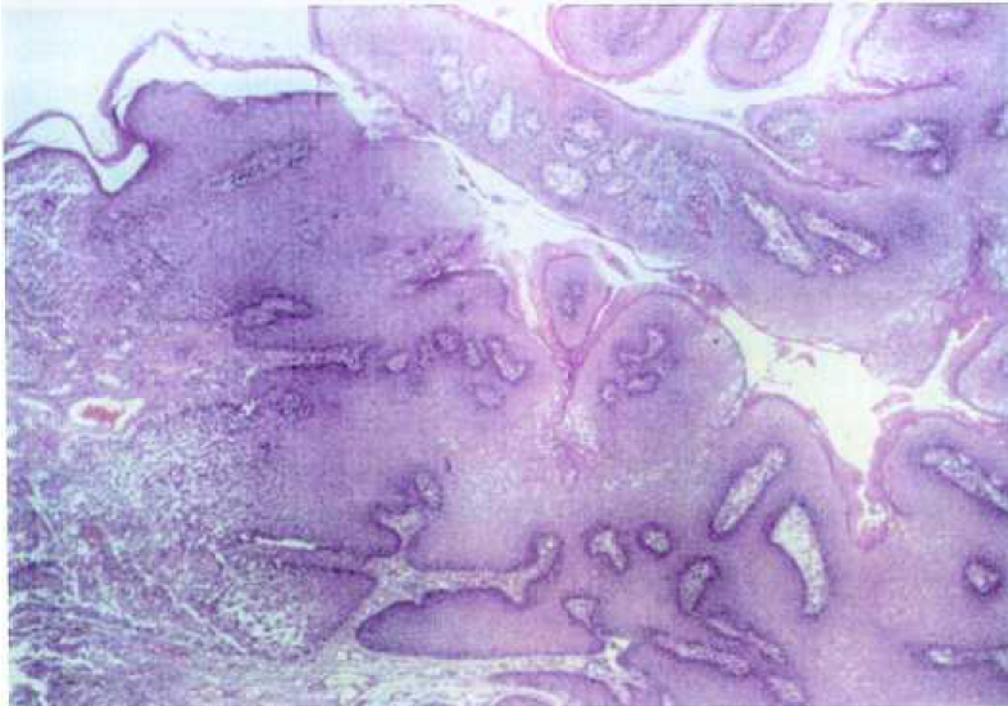


Figura I.15. Carcinoma verrucoso de vulva. (Hematoxilina-eosina, x 40).

I.3.3.3. Carcinoma de células pequeñas.

Está constituido por células pequeñas y uniformes, que forman agregados de forma irregular con poca cohesión y amoldamiento nuclear. Suelen infiltrar extensamente el estroma subyacente. Esta neoplasia se caracteriza por la presencia de invasión vascular y la carencia de respuesta inflamatoria¹⁸². Frecuentemente se asocian con producción de hormonas peptídicas¹⁸².

I.3.3.4. Adenocarcinoma de cérvix.

En un examen macroscópico, el 50% de los pacientes con un adenocarcinoma cervical presentan masas papilares o polipoides, mientras que aproximadamente en un 15% de pacientes no se observa lesión, porque el adenocarcinoma se localiza internamente en el canal endocervical¹⁷⁸. Histológicamente hay muchas variaciones en el tipo celular y en la forma de

crecimiento. Los más frecuentes son los de tipo endocervical, que se originan en el endocérnix y son bien o moderadamente diferenciados. Están constituidos por células columnares endocervicales conteniendo mucina intracelular, que se ordenan según una estructura glandular compleja en forma de racimos, que reproducen la configuración de la mucosa endocervical normal^{178,183} (Fig. I.16).

I.3.4. TIPOS DE HPV ASOCIADOS CON DIFERENTES LESIONES.

A partir de numerosos estudios con técnicas de biología molecular (Southern blot, Reverse blot, Dot blot, Hibridación *in situ*), se ha observado una asociación específica de algunos tipos de HPV con ciertas lesiones^{106,112,113,127,134-139,150-156,184-199}, lo que sugiere que distintos tipos de HPV tienen diferente potencial oncogénico. Todo ello ha conducido a agrupar los HPV genitales en tres categorías o grupos de riesgo con respecto a la carcinogénesis:

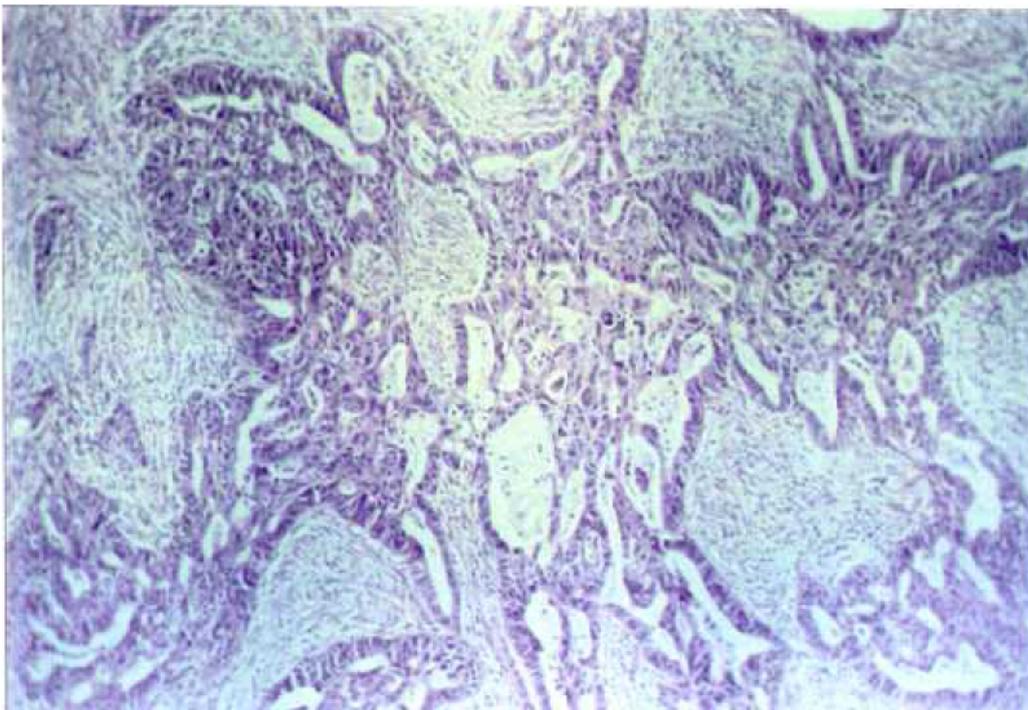


Figura I.16. Adenocarcinoma bien diferenciado de cérvix. (Hematoxilina-eosina, x 100).

1. **HPV genitales de bajo riesgo**, entre los que se encuentran los tipos 6, 11, 42, 43 y 44 (los más representativos son los tipos 6 y 11).

Estos tipos de HPV se asocian predominantemente a lesiones benignas (condiloma acuminado y LSIL), fruto de infecciones productivas. Sin embargo, no hay que confundir "bajo riesgo" con "ausencia de riesgo". De hecho se han identificado los tipos 6 y 11 de HPV en algunas lesiones malignas^{135,137,185,200-203}. El estudio de estos casos poco frecuentes sugiere que una alteración específica en la región URR del genoma vírico puede alterar virus habitualmente no oncogénicos de manera tal que produzcan una neoplasia invasiva²⁰⁰⁻²⁰³.

2. **HPV genitales de alto riesgo**, entre los que se encuentran los tipos 16, 18, 45 y 56 (los más representativos son los tipos 16 y 18).

Estos tipos virales se detectan en mayor proporción en HSIL y lesiones invasivas, como consecuencia de infecciones no productivas.

HPV 16 es el tipo que se encuentra con mayor frecuencia en carcinomas de células escamosas²⁰⁴, mientras que HPV 18 es el tipo más frecuente en adenocarcinomas^{97,205-207} y en carcinomas de células pequeñas⁹⁹.

A diferencia de HPV 16, que se detecta en proporciones similares en HSIL y lesiones invasivas, HPV 18 se detecta más en lesiones invasivas que en HSIL^{118,189}. Para explicar este hecho algunos autores sugieren que HPV 18 tiene mayor potencial oncogénico que otros tipos virales de alto riesgo, por lo que las lesiones producidas por este tipo progresarían más rápidamente^{184,189} y por ello podrían tener peor pronóstico.

Tipos de HPV de alto riesgo se han encontrado también, aunque en proporción mucho menor, en LSIL e, incluso, en epitelios

histológicamente normales, produciendo infecciones latentes de pronóstico desconocido^{106,110,111,154}.

3. **HPV genitales de riesgo intermedio**, entre los que se encuentran los tipos 31, 33, 35, 39, 51, 52 y 58 (los más representativos son los tipos 31 y 33).

Estos tipos virales se encuentran en proporciones similares en LSIL y HSIL, y en un porcentaje ligeramente inferior en carcinomas invasivos^{118,136,174,189}. Algunos autores hipotetizan que las lesiones producidas por estos tipos de HPV evolucionan muy lentamente en un sentido u otro (progresión o regresión), jugando un papel muy importante la respuesta inmune de la persona infectada^{207,208}.

I.4. DIAGNOSTICO DE LA INFECCION GENITAL POR HPV.

La imposibilidad de cultivar el HPV *in vitro*, ha determinado que el diagnóstico de esta infección se realice aplicando una serie de técnicas que van desde la mera observación clínica de las lesiones producidas por el virus hasta la amplificación de secuencias génicas específicas de los distintos tipos virales, pasando por la detección anatomopatológica de las alteraciones celulares producidas por el virus, la observación por microscopía electrónica de las partículas víricas, la detección de antígenos víricos por métodos inmunológicos y la detección de secuencias de ácidos nucleicos específicas de HPV por técnicas de hibridación molecular (tabla I.IV).

A continuación se desarrollan brevemente las distintas técnicas de diagnóstico, con especial énfasis en la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ*, por ser las técnicas empleadas en el presente estudio.

OBSERVACION CLINICA DE LESIONES	HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS
<ul style="list-style-type: none"> · Observación directa. · Tinciones. · Colposcopia. 	<ul style="list-style-type: none"> · Southern blot. · Dot blot. · Reverse blot. · Técnica sandwich. · Hibridación <i>in situ</i> <ul style="list-style-type: none"> - En tejido - En filtro
CITOLOGIA/HISTOLOGIA <ul style="list-style-type: none"> · Citología cérvico-vaginal · Biopsia genital. 	AMPLIFICACION DE DNA <ul style="list-style-type: none"> · PCR · PCR <i>in situ</i>
MICROSCOPIA ELECTRONICA	
TECNICAS INMUNOLOGICAS <ul style="list-style-type: none"> · ELISA. · Western blot. · Inmunohistoquímica. 	

Tabla I.IV. Técnicas utilizadas en el diagnóstico de la infección genital por HPV.

I.4.1. OBSERVACION CLINICA DE LAS LESIONES.

I.4.1.1. Observación directa.

La observación directa del tracto genital femenino inferior únicamente permite detectar la presencia de lesiones exofíticas de tipo verrucoso o polipoide, siendo imposible en muchas ocasiones hacer el diagnóstico diferencial entre un condiloma acuminado (lesión producida por HPV) y un pólipo (lesión no producida por HPV). A nivel de cérvix uterino la observación directa no permite distinguir en la mayoría de las ocasiones un epitelio displásico de uno normal.

Con el fin de obtener mayor información se han desarrollado métodos de tinción, de los que el más usado es el test de Schiller^{117,208}. Se basa en que al aplicar una solución diluida de yodo en un exocérvis normal, toda la mucosa se tiñe de un color marrón caoba oscuro, por la presencia de glucógeno intracelular. Las áreas con apariencia clínica normal que no se tiñen pueden corresponder a zonas de epitelio displásico, desprovisto de glucógeno (fig I.17). Sin embargo,

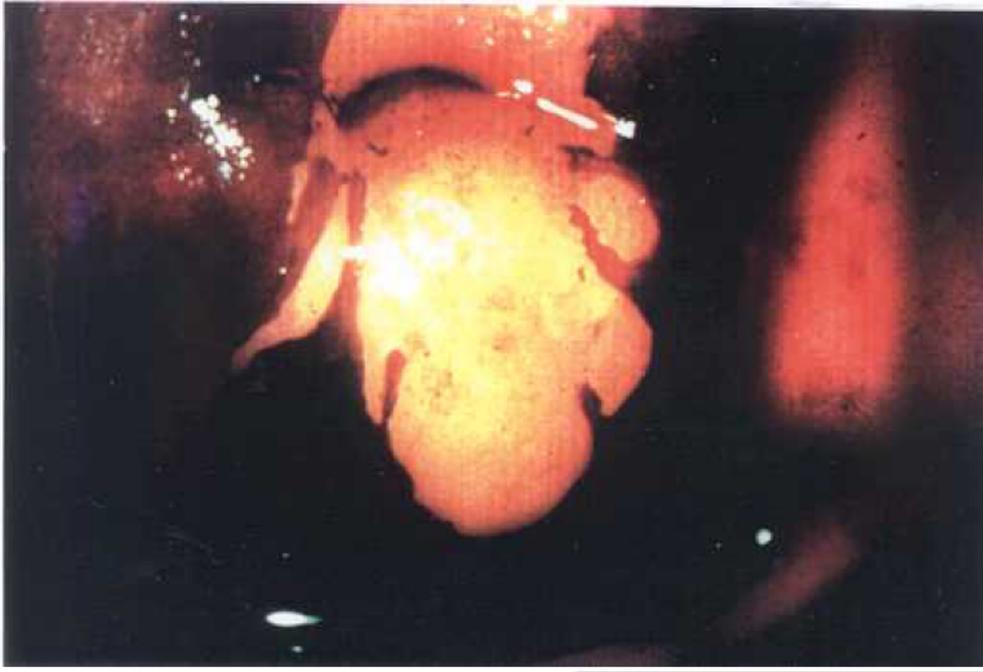


Figura I.17. Imagen colposcópica de cérvix uterino en la que se observa un área negativa con la tinción de yodo.

este test no es bueno para diagnosticar la infección por HPV ya que hay lesiones yodo negativas que no son producidas por HPV (epitelio metaplásico y reacciones inflamatorias) y viceversa, lesiones displásicas producidas por HPV que son yodo positivas²⁰⁸.

I.4.1.2. Colposcopia.

La colposcopia consiste en la observación del cérvix uterino mediante el colposcopio, instrumento óptico de amplificación, binocular y estereoscópico, que permite obtener imágenes tridimensionales de los tejidos superficiales. De esta manera se pueden visualizar las modificaciones morfológicas del epitelio que acompañan a la infección por HPV.

El diagnóstico colposcópico se basa en la evaluación de varios parámetros: el tono de color (rosa, blanco, etc.) y opacidad de la mucosa, el contorno de la

superficie (lisa, rugosa, espiculada, punteada, en forma de mosaico, etc.) y el patrón vascular del sistema capilar subepitelial.

El análisis colposcópico se completa con la aplicación de ácido acético al 4-5% sobre las mucosas en estudio (test de Hinselman), que elimina el moco y deshidrata las células. Las zonas con queratinización superficial anormal, hiperplasia o aumento de la densidad nuclear aparecen blancas^{100,117,209}.

Las alteraciones epiteliales que produce la infección por HPV determinan también anomalías en la red vascular subepitelial, dando lugar a patrones colposcópicos característicos. Las imágenes colposcópicas que se corresponden histológicamente con lesiones intraepiteliales escamosas consisten en lesiones de color blanco, visibles sólo después de la aplicación de ácido acético, con bordes definidos, y en las que o bien los capilares subendoteliales no son visibles, o bien aparece un punteado rojo o un patrón de tipo mosaico. En ocasiones se observan áreas blancas de superficie rugosa, visibles antes de la aplicación del ácido acético (leucoplasias), que normalmente corresponden a zonas de hiperqueratosis o paraqueratosis, pero que en ocasiones pueden también corresponder a lesiones intraepiteliales producidas por HPV^{117,208,209}.

Finalmente, algunas lesiones de alto grado y carcinomas invasivos pueden presentar también una apariencia colposcópica de vasos atípicos debido a capilares con zonas de dilatación y constricción y ramificaciones anómalas, e incluso se pueden observar lesiones exofíticas.

En resumen, la colposcopia permite observar lesiones compatibles con infección por HPV, aunque no permite saber el grado de la lesión ni el tipo de HPV que la origina. Por ello, lo indicado en estos casos es la toma de biopsias de la zona afectada para su posterior estudio.

El colposcopio se utiliza también para observar los tejidos de vulva (vulvoscopía) y vagina (vaginoscopia).

I.4.2. DIAGNOSTICO ANATOMOPATOLOGICO.

I.4.2.1. Citología exfoliativa cérvico-vaginal.

La técnica anatomopatológica más usada para el diagnóstico de lesiones del tracto genital femenino inferior es la citología exfoliativa cérvico-vaginal de tres tomas teñida por el método de Papanicolau. Su amplia utilización como técnica rutinaria diagnóstica se basa en su probada efectividad para reducir el riesgo de cáncer cervical por la detección precoz de lesiones precursoras, unido a su bajo costo y a que la toma de la muestra es muy sencilla y poco agresiva. Se ha estimado que la mortalidad por cáncer cervical puede disminuir en un 70% mediante el estudio de una citología cada 3 años como media, dependiendo de las características de la población estudiada^{210,211}.

El diagnóstico citológico de la infección por HPV se basa en la observación de dos alteraciones celulares, principalmente a nivel de las células superficiales:

1. Coilocitosis:

El coilocito representa la alteración celular más característica producida por el virus. El núcleo de esta célula puede ser único o múltiple, de forma irregular e hiper cromático. Presenta un halo perinuclear característico, a menudo irregular, y el citoplasma periférico tiene una densidad aumentada y presenta características tintoriales anfófilas^{34,35} (figs. I.18 y I.19).

2. Disqueratosis:

Consiste en la presencia de células queratinizadas en zonas del epitelio donde no debería haberlas. La célula disqueratósica típica presenta un núcleo pequeño, denso e hiper cromático, de un tamaño

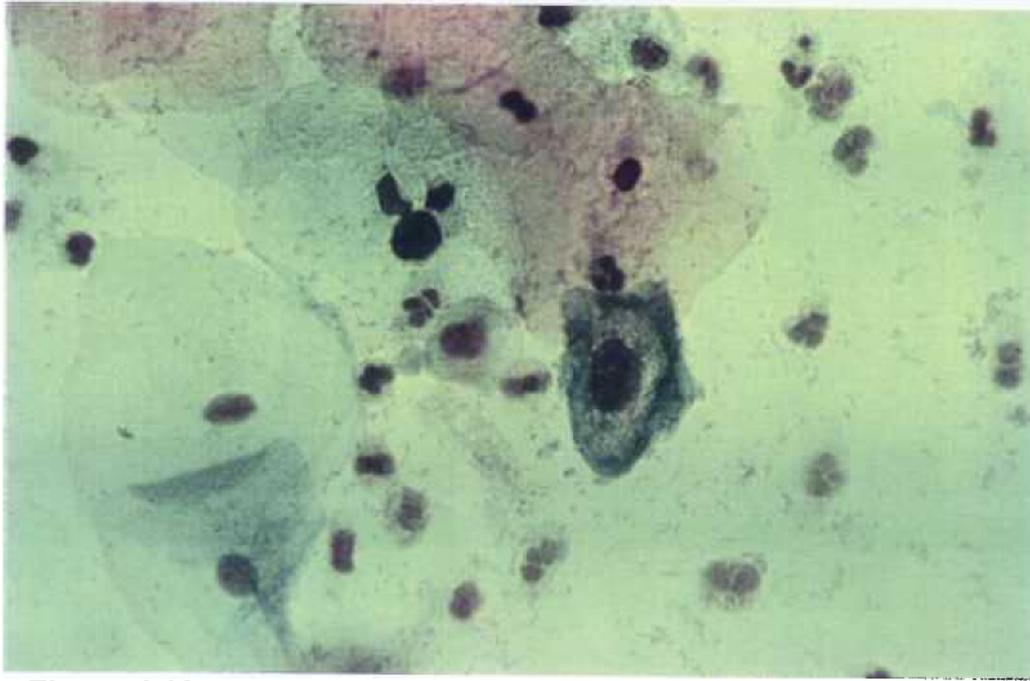


Figura I.18. Frotis vaginal diagnosticado de LSIL en el que se observa una célula coilocítica. (Tinción de Papanicolaou, x 640).

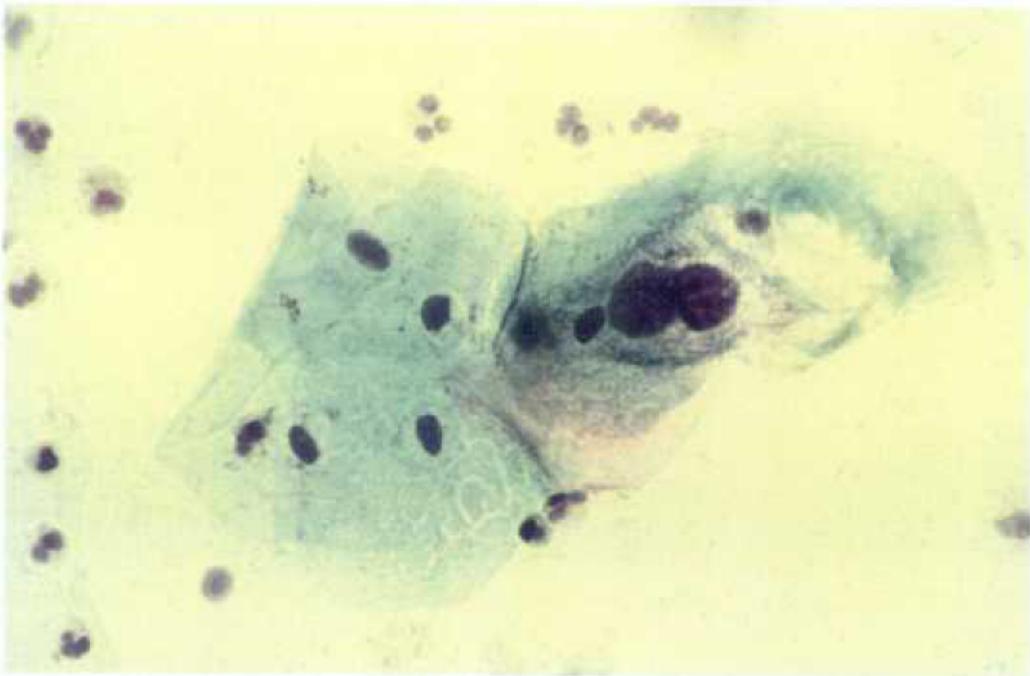


Figura I.19. Detalle de un coilocito binucleado en un frotis vaginal diagnosticado de LSIL. (Tinción de Papanicolaou, x 640).

similar al de una célula intermedia. El citoplasma es denso y se tiñe de color naranja o amarillento con la tinción de Papanicolau^{34,35,212}.

La observación conjunta de ambas alteraciones celulares es altamente sugestiva de infección por HPV, mientras que la observación de una sola de ellas es mucho menos específica.

Las características citológicas de LSIL incluyen, además de las dos anteriormente citadas, anisonucleosis e hiper cromatismo y, en ocasiones, paraqueratosis e hiperqueratosis (fig 1.20). Generalmente estas lesiones presentan una atipia nuclear mínima en las células de capas inferiores y muestran maduración superficial⁹⁶.

La separación citológica entre LSIL y HSIL viene determinada por dos factores: el aumento del número de células menos maduras y un incremento en la atipia nuclear en un alto porcentaje de células. Concretamente, los núcleos suelen ser mayores, de contornos irregulares y con distribución anormal de la cromatina⁹⁶ (fig. 1.21).

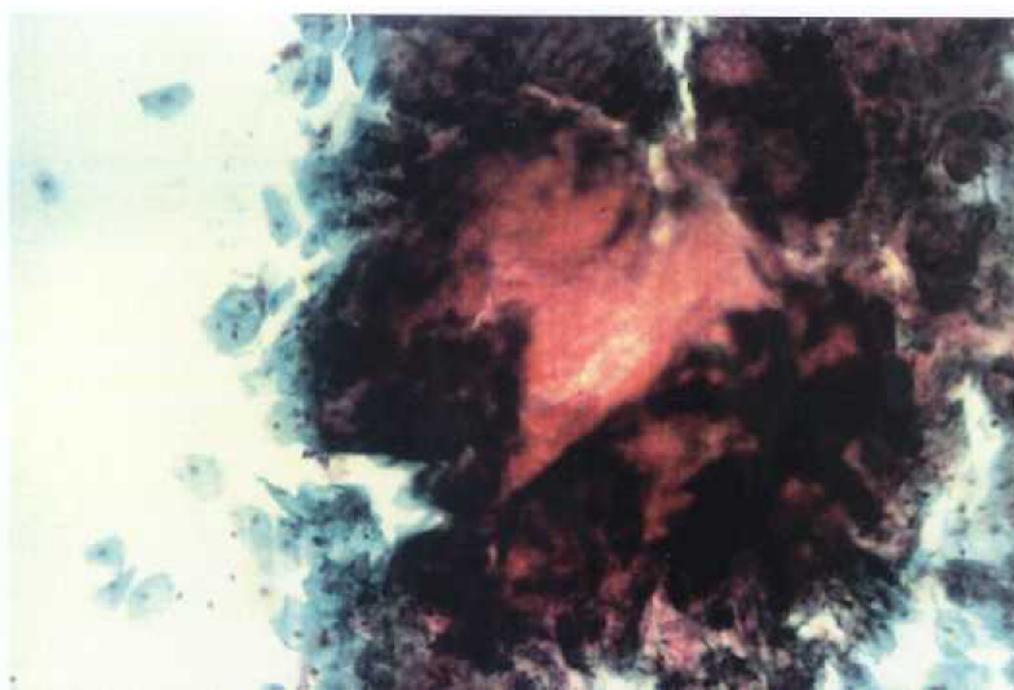


Figura 1.20. Placa de hiperqueratosis en un frotis vaginal diagnosticado de infección por HPV. (Tinción de Papanicolaou, x 160).

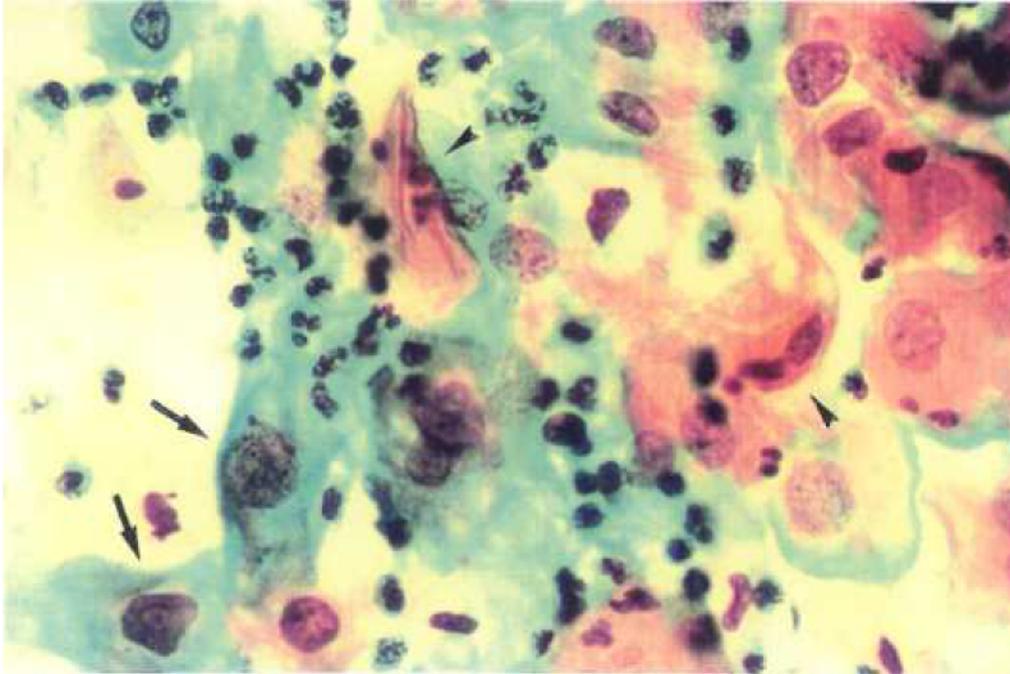


Figura I.21. Frotis cérvico-vaginal diagnosticado de HSIL, en el que se aprecia displasia coilocítica (flecha larga) y paraqueratosis (flecha corta). (Tinción de Papanicolaou, x 640).

A pesar de las numerosas ventajas que la citología cérvico-vaginal tiene como técnica rutinaria para el diagnóstico precoz del cáncer, tiene también varios inconvenientes en lo que respecta al diagnóstico de la infección genital por HPV:

- Elevada proporción de falsos negativos. Algunos autores sitúan entre el 11 y el 23% el porcentaje de citologías positivas para SIL incorrectamente diagnosticadas como normales^{213,214}. Este porcentaje de falsos negativos es superior con respecto al diagnóstico de infección por HPV, ya que además es imposible detectar citológicamente las infecciones latentes (que no producen alteraciones celulares), y muchas lesiones de alto grado cursan sin coilocitosis, siendo diagnosticadas sólo de HSIL en lugar de HSIL compatible con infección por HPV.

- Imposibilidad de conocer el tipo de HPV causante de una lesión. Las lesiones producidas por los distintos tipos de HPV genitales son todas

citológicamente idénticas, por lo que no es posible saber el tipo de HPV presente en una lesión, a pesar de la importancia que esto tiene como factor pronóstico para intentar predecir su evolución.

I.4.2.2. Biopsia genital.

La toma de una biopsia genital para su estudio anatomopatológico está indicada siempre que se observe una lesión en una exploración colposcópica y cuando se obtenga un resultado citológico anormal, aunque la colposcopia sea normal, en cuyo caso conviene realizar cuatro biopsias cervicales en los cuatro puntos cardinales de la topografía exocervical.

Los criterios histológicos de LSIL y HSIL ya han sido señalados con anterioridad (página 28).

El diagnóstico de la infección por HPV no debe basarse exclusivamente en la presencia de coilocitosis, a pesar de que éste sea una alteración celular relativamente específica del virus. Esto es debido a que otras situaciones pueden producir también este efecto, como la degeneración vacuolar relacionada con atrofia en mujeres postmenopáusicas, la tricomoniasis, la candidiasis y la infección por *Gardnerella vaginalis*¹¹⁷. Así pues, la coilocitosis se considera un marcador de la infección por HPV sólo cuando se observan otras dos de las siguientes características histológicas¹¹⁸ (fig. 1.22):

- Binucleación y multinucleación.

- Disqueratosis.

- Papilomatosis.

- Contorno nuclear irregular.

El estudio de una biopsia genital para el diagnóstico de la infección por HPV presenta los mismos inconvenientes que la citología cérvico-vaginal, puesto que tampoco permite detectar las infecciones latentes, en las que no hay alteración histológica, ni permite conocer el tipo de HPV presente en una lesión, puesto que las lesiones producidas por los distintos tipos virales son histológicamente iguales.

I.4.3. MICROSCOPIA ELECTRONICA.

El diagnóstico de la infección genital por HPV mediante microscopía electrónica se basa en la observación intranuclear de partículas víricas con un tamaño acorde con el del virión de HPV (50-55 nm).

A pesar de que la cápside es icosaédrica, los HPV tienen una apariencia esférica y suelen agruparse formando pseudocristales (fig. I.22).

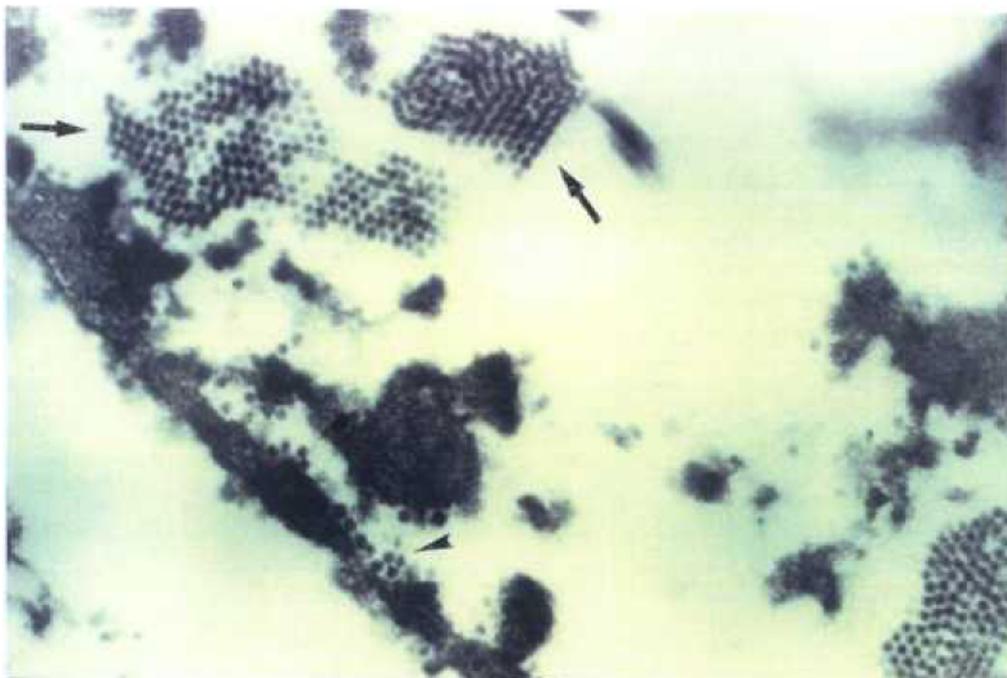


Figura I.22. Microfotografía electrónica del núcleo de un coilocito con partículas víricas compatibles con HPV, tanto aisladas (flecha corta) como formando agrupaciones características (flecha larga). (x 44.000)

Se han observado partículas víricas en todos los tipos de lesiones asociados a HPV, pero siempre en coilocitos y células disqueratóicas^{46,215-223}. Sin embargo, esta técnica presenta grandes inconvenientes que no la hacen recomendable para el diagnóstico rutinario de esta infección:

- Baja sensibilidad. Cuando se la compara con criterios clínicos, citológicos e histológicos, la sensibilidad de la microscopía electrónica para detectar la infección por HPV oscila entre un 10 y un 50%, según los distintos autores y el tipo de lesiones estudiados^{46,215,219-222}, siendo máxima en LSIL y mínima en HSIL y carcinomas.
- Imposibilidad de saber el tipo de HPV presente en una lesión, ya que todos los tipos virales tienen la misma morfología.

I.4.4. METODOS INMUNOLOGICOS.

El diagnóstico inmunológico de la infección por HPV se basa, bien en la detección de anticuerpos específicos dirigidos contra los distintos tipos de HPV en el suero y/o secreciones cervicales y vaginales de los pacientes infectados mediante ELISA y Western blot, bien en la detección de antígenos víricos en cortes de tejido mediante técnicas de inmunohistoquímica.

I.4.4.1. Serología.

Ante la ausencia de un sistema de propagación de HPV en cultivo, los primeros estudios de la respuesta humoral en pacientes infectados por HPV se realizaron con viriones purificados obtenidos por centrifugación en gradientes de densidad a partir de extractos de tejido lesional^{224,225}. Sin embargo, estos estudios presentaron muchos problemas, entre los que cabe señalar la pureza de la

preparación antigénica y la heterogeneidad de las poblaciones estudiadas en cuanto a edad, estado inmune, tipos de lesión y tipos de HPV responsables de la infección.

Por ello, la tecnología ha evolucionado hacia la obtención de proteínas virales específicas *in vitro*. La estrategia con la que se están obteniendo mejores resultados consiste en la obtención de proteínas de fusión, que implica la utilización de vectores de expresión. Estos son plásmidos de ADN que contienen un gen que codifica para una proteína conocida, cuya síntesis se puede inducir artificialmente en cultivos bacterianos. La técnica consiste en clonar una secuencia de ADN de HPV correspondiente a una unidad de transcripción concreta, insertándola en el vector de expresión a continuación del gen conocido y con la orientación adecuada, de manera que al inducir la síntesis de proteínas se obtiene una proteína quimérica de fusión, en la que la proteína codificada por la secuencia de HPV está unida covalentemente a la proteína codificada por el vector de expresión original^{94,226-228}. Los estudios más intensivos, en este sentido, han sido realizados por Firzlaff y cols.²²⁶ y Jenison y cols.²²⁷, clonando secuencias de ADN de HPV 6, 16 y 18 en el vector pATH, plásmido que contiene el gen que codifica para la antranilato sintetasa o gen Trp E. Las proteínas de fusión así obtenidas se utilizan posteriormente para detectar anticuerpos anti-HPV en el suero de pacientes mediante técnicas inmunológicas como el ELISA y el Western blot^{227,229-232}.

Otra estrategia consiste en el estudio de oligopéptidos sintéticos solapantes que cubren unidades transcripcionales del genoma vírico, a fin de encontrar epitopos lineales específicos de tipo para desarrollar, como en el caso anterior, métodos diagnósticos que permitan identificar anticuerpos específicos anti-HPV tanto en el suero como en secreciones cervicales y vaginales de pacientes^{233,234}.

I.4.4.2. Inmunohistoquímica (IHQ).

En 1978, Orth y colaboradores informaron que el suero de un conejo con un tumor derivado de un papiloma producido por un virus del papiloma reaccionaba con verrugas cutáneas humanas²³⁵. Esta reactividad desaparecía al incubar el suero de conejo con viriones de HPV desnaturalizados con álcali.

Dos años más tarde, en 1980, Jenson y cols.⁴³ comprobaron que anticuerpos obtenidos contra viriones rotos de HPV procedentes de verrugas cutáneas daban reacción cruzada con todos los virus del papiloma y, en 1981, Kurman y cols.⁴⁴ informaron que antisueros anti-virus del papiloma bovino (BPV) daban también reacción cruzada con todos los virus del papiloma.

Esta característica se ha utilizado para detectar la presencia de HPV en cortes de biopsias genitales mediante métodos inmunohistoquímicos. Las técnicas más usadas se basan en la utilización de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) y del complejo avidina-biotina (ABC), de mayor sensibilidad^{236,237}, empleando como anticuerpo primario un anticuerpo policlonal obtenido inmunizando conejos con viriones rotos de BPV o de HPV procedentes de verrugas cutáneas. Este anticuerpo reacciona con la proteína principal de la cápside del virus, codificada por la región L1 del genoma vírico²³⁸⁻²⁴⁰, por lo que el marcaje se detecta exclusivamente en células diferenciadas del tercio superior del epitelio, fundamentalmente coilocitos^{44,157,237,239-243}, en las que tiene lugar la síntesis de las proteínas estructurales del virus.

El uso inmunohistoquímico de este anticuerpo es sólo útil en infecciones productivas, como lo demuestra el hecho de que el número de biopsias antígeno-positivas disminuye a medida que aumenta la severidad de la lesión^{240,244-247}.

Otro inconveniente de las técnicas de inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-virus del papiloma es que únicamente sirven como técnicas de detección y no de tipado, ya que al utilizarse un anticuerpo específico de género

reacciona por igual con todos los tipos de HPV. A fin de paliar esto, se están ensayando anticuerpos obtenidos a partir de proteínas de fusión o de oligopéptidos sintéticos dirigidos contra epitopos específicos de los distintos tipos virales^{239,248-252}. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento son contradictorios, sobre todo cuando se comparan con los obtenidos mediante Western blot y ELISA^{239,252}. Incluso en ocasiones los resultados varían dependiendo de que las biopsias utilizadas en estos estudios hayan sido congeladas o fijadas en formol e incluidas en parafina²⁵³. Por ello, y teniendo en cuenta además que el número de anticuerpos específicos de distintos tipos virales es todavía muy reducido, el tipado inmunohistoquímico de una lesión producida por HPV no es posible en la actualidad de manera rutinaria.

I.4.5. HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS.

El diagnóstico de la infección genital por HPV mediante técnicas de hibridación se basa en la detección de secuencias de ácidos nucleicos, ADN o ARN, específicas de HPV mediante el uso de sondas marcadas.

Las sondas son moléculas de ácidos nucleicos cuya secuencia de nucleótidos es complementaria de aquella que se quiere detectar. Para el tipado de HPV habitualmente se usan sondas de ADN obtenidas clonando el genoma completo de cada tipo de HPV aislado, o una parte de él, en plásmidos bacterianos. A continuación, o bien se marca el plásmido completo, o bien se libera el ADN de HPV del plásmido mediante la adecuada enzima de restricción y se marca después de purificarlo por electroforesis en gel.

El marcaje de estas sondas puede ser radioactivo (³H, ³²P, ³⁵S) o no radioactivo (biotina, digoxigenina), siendo las técnicas de "nick translation"²⁵⁴ y "random primer"²⁵⁵ las más utilizadas para realizar este marcaje.

De forma alternativa se pueden obtener sondas de ARN insertando el ADN

de interés en un vector que contenga un promotor de ARN polimerasa. Posteriormente, se sintetiza una sonda de ARN marcada usando ARN polimerasa y nucleótidos marcados¹²⁸.

Se han utilizado una gran variedad de técnicas de hibridación para tipar el HPV presente en muestras ginecológicas. Algunas de estas técnicas requieren aislamiento del ADN celular, mientras que otras se realizan sobre cortes de tejido o células procedentes de citologías ginecológicas. A continuación se comenta brevemente la teoría de hibridación, en la que se basan estas técnicas, y se describen someramente las más utilizadas en el diagnóstico de la infección por HPV. En la tabla I.V se comparan la sensibilidad, ventajas e inconvenientes de las mismas.

I.4.5.1. Teoría de hibridación.

Las técnicas de hibridación se basan en el apareamiento de dos cadenas de ácidos nucleicos, sonda y secuencia diana, en virtud de la complementariedad de las bases nitrogenadas que constituyen su secuencia. En este sentido, hay que tener en cuenta varios puntos:

- La estabilidad del híbrido depende de la composición de bases de ambas cadenas, la longitud del híbrido, la concentración salina del buffer en el que se realiza la hibridación, la temperatura a la que ésta se lleva a cabo y el porcentaje de bases no complementarias entre las dos cadenas ("mismatch", según la terminología inglesa).

Aplicado a la hibridación de moléculas de ADN de varios cientos de nucleótidos de longitud todo esto se puede expresar por la fórmula⁷²:

$$T_m = 81.5 + 16.6 (\log M) + 0.41 (\%G+C) - 0.72 (\% \text{ formamida})$$

donde T_m o temperatura de fusión es la temperatura a la cual la mitad

de los dúplex están disociados. **M** es la concentración de cationes monovalentes en moles/l y **%G+C** es el porcentaje de residuos de guanina más citosina en el ADN.

- La temperatura óptima de formación del híbrido es 25°C por debajo de la T_m del dúplex.
- Para un dúplex de más de 150 pares de bases la T_m disminuye 1°C por cada 1% de bases no complementarias⁷².

La "permisividad" de una hibridación ("stringency", según la terminología inglesa) se define como el número de grados centígrados por debajo de la T_m a los que se realiza la hibridación o el lavado de posthibridación, y se expresa como T_m - número de grados.

En el caso de HPV, las condiciones relajadas de hibridación ("low stringency", según la terminología inglesa) se definen como T_m - 43°C. Esto se consigue utilizando concentraciones bajas de formamida en el tampón de hibridación (alrededor del 20%) y aumentando la concentración salina en el tampón del lavado de posthibridación. Con estas condiciones se consigue que híbridos con un 33% de bases desapareadas permanezcan estables²⁵⁶.

Las condiciones estrictas de hibridación ("high stringency", según la terminología inglesa) más utilizadas para HPV se definen como T_m - 25°C. Esto se consigue aumentando la concentración de formamida en el tampón de hibridación (alrededor del 50%) y disminuyendo la concentración salina en el lavado de posthibridación. Con estas condiciones se consigue que permanezcan estables híbridos con un 13% de bases desapareadas²⁵⁶. Sin embargo, si se quiere aumentar más la especificidad, aún a costa de perder sensibilidad, la hibridación se puede llevar a cabo en condiciones todavía más estrictas, hasta T_m - 5°C^{97,98,257}.

El uso de unas condiciones u otras depende del objetivo que se persiga.

Cuando la información que se quiere obtener es, simplemente, si una lesión está producida por un HPV o no ("screening" o "detección") lo ideal es realizar una hibridación en condiciones relajadas utilizando un cóctel de sondas específicas de varios tipos de HPV o bien sondas específicas de las regiones más conservadas del genoma de HPV (E1 y L1 principalmente, seguidas por E2 y L2)^{75,81,258}. En estas condiciones, la probabilidad de detectar la presencia de cualquier HPV, incluidos tipos aún no descritos, es muy elevada. Por el contrario, cuando se quiere conocer el tipo de HPV presente en una lesión ("tipado") lo ideal es utilizar varias sondas específicas de distintos tipos virales y realizar las hibridaciones en condiciones estrictas, con lo que únicamente se obtendrá una reacción positiva con la sonda específica del tipo viral presente en la lesión.

I.4.5.2. Southern blot.

El Southern blot se considera la técnica de referencia para el tipado de HPV en lesiones genitales. Fue descrita por primera vez por Southern en 1975²⁵⁹ y, básicamente, consiste en lo siguiente:

El ADN celular total de la muestra en estudio se extrae y se digiere con una enzima de restricción. Los fragmentos obtenidos se separan mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida. A continuación el ADN se desnaturaliza y se transfiere a filtros de nylon o nitrocelulosa. Finalmente, el ADN en el filtro se hibrida con sondas apropiadas para el estudio que se está realizando.

Para la detección de HPV en muestras genitales las enzimas de restricción más utilizadas son la Pst I y la Hpa II⁹⁶, ya que el tamaño de los fragmentos que producen son diferentes para cada uno de los tipos de HPV que infectan más frecuentemente el tracto genital. Una vez transferido el ADN al filtro de nitrocelulosa se puede realizar una hibridación con un cóctel de sondas de HPV en condiciones relajadas, con lo que se obtiene una información sugestiva del tipo

de HPV presente en la muestra según el patrón de bandas obtenido con el enzima de restricción. El tipado definitivo sólo es posible realizando una serie de hibridaciones con sondas únicas específicas de los distintos tipos de HPV en condiciones estrictas⁷².

A pesar de ser una técnica de gran sensibilidad y especificidad, el Southern blot presenta algunos inconvenientes cuando se considera su uso rutinario como método diagnóstico (tabla I.V). Concretamente, requiere cantidades relativamente grandes de ADN celular de partida (10 μg), obtenido de material no fijado, y utilizar sondas de ADN marcadas con ³²P con alta actividad específica (2-4 x 10⁸ cpm/ μg). En estas condiciones se pueden detectar 0.1-1 pg de ADN de HPV, lo que equivale aproximadamente a 1 copia de ADN de HPV por 10-100 células^{72,260}. La técnica se puede realizar también a partir de ADN extraído de tejido fijado en formol²⁶¹⁻²⁶⁴, pero la sensibilidad disminuye mucho, hasta el punto de que se pueden obtener porcentajes de detección de ADN de HPV inferiores en un 70% a los obtenidos en material no fijado de las mismas lesiones²⁶⁴. Algo similar ocurre con el marcaje, de forma que la sensibilidad disminuye mucho cuando se usan sondas no marcadas radioactivamente.

I.4.5.3. Dot blot.

El Dot blot se desarrolló para facilitar el análisis rápido de un gran número de muestras. La diferencia principal con el Southern blot consiste en que el ADN en estudio se coloca directamente sobre el filtro en el que se llevará a cabo la hibridación. La técnica puede realizarse de dos maneras diferentes⁹⁶:

- A) Se extrae el ADN celular total de la muestra en estudio y se coloca puntualmente sobre un filtro de nitrocelulosa o nylon mediante un sistema de vacío. Después el ADN es desnaturalizado, neutralizado y fijado al filtro para poder realizar la hibridación.

- B) Una suspensión celular de partida se incuba con un tampón de digestión, se trata con álcali para desnaturalizar el ADN y a continuación se coloca la suspensión entera sobre un punto del filtro donde se llevará a cabo la hibridación.

Esta técnica permite la detección de cantidades muy pequeñas de ADN de HPV (0.01 pg de ADN)²⁶⁵, probablemente debido a la concentración que experimenta la muestra. Sin embargo, ésta es también la causa de su principal inconveniente: se produce un porcentaje elevado de hibridación no específica y, en consecuencia, de falsos positivos, posiblemente porque la muestra se concentra tanto que no es posible bloquear todas las secuencias de ADN celulares mediante prehibridación.

Así pues, para su uso rutinario se parte de cantidades pequeñas de ADN celular (300-500 ng) y la hibridación se realiza sólo en condiciones estrictas, consiguiéndose así una sensibilidad aproximada de 1 copia de ADN de HPV/célula.

I.4.5.4. Reverse blot.

El Reverse blot es la técnica contraria al Southern blot. De Villiers y cols. fueron los primeros en aplicarla al estudio de la infección por HPV¹⁸⁶, siendo modificada posteriormente por Webb y cols.¹⁵⁸.

En este método, el ADN clonado de los distintos tipos de HPV aislados se separa del vector plasmídico, se digiere con enzimas de restricción (PstI) y los fragmentos resultantes se separan mediante electroforesis en gel y se transfieren a filtros de nitrocelulosa. A continuación se hibridan con 500 ng de ADN celular, previamente radiomarcado, procedente de la muestra en estudio. Cualquier ADN de HPV presente en la muestra hibridará con el ADN del tipo de HPV presente

en el filtro que sea complementario. La hibridación puede realizarse en condiciones relajadas y estrictas, permitiendo tanto la detección como el tipado de HPV. La sensibilidad de la técnica es de aproximadamente 1 copia de ADN de HPV/célula¹⁵⁸.

Su principal desventaja es que requiere reacciones de marcaje individuales para cada ADN celular que se quiera analizar, lo que la hace bastante laboriosa y larga.

I.4.5.5. Hibridación *in situ* en tejido (HIS).

La hibridación *in situ* en tejido se diferencia de las técnicas anteriores en que no es necesario extraer el ADN celular, sino que la hibridación se realiza directamente sobre cortes del tejido. Este método aporta, por lo tanto, información adicional sobre la distribución topográfica de los ácidos nucleicos de HPV en una lesión.

Varios factores influyen en los resultados obtenidos con esta técnica:

1. Fijación del tejido:

El fijador ideal para realizar técnicas de HIS ha de cumplir dos condiciones: conservar histológicamente el tejido lo mejor posible y evitar la degradación de los ácidos nucleicos virales. En este sentido, los mejores resultados se obtienen con paraformaldehído²⁶⁶, a pesar de que no suele utilizarse de manera rutinaria. De los fijadores usados habitualmente, el más apropiado para realización de esta técnica es el formol tamponado^{264,267}, que cumple perfectamente las dos condiciones señaladas anteriormente. Por el contrario, hay que evitar en lo posible el empleo de la solución de Bouin como fijador, ya que, si bien conserva mejor la arquitectura del tejido que el formol tamponado,

produce degradación del ADN. En un estudio realizado por Nuovo y Richart²⁶⁷ comparando ambos fijadores, tras ocho horas de fijación la señal de hibridación en las muestras fijadas con solución de Bouin era un 50% menor que la obtenida en muestras fijadas con formol tamponado.

2. Adherencia del tejido al portaobjetos:

Dado que esta técnica se realiza directamente sobre cortes del tejido es fundamental que éstos no se despeguen del portaobjetos a lo largo del proceso. Con los adhesivos habituales (albúmina, gelatina-alumbre de cromo, cola de Elmer, etc.) el porcentaje de cortes que se despegan es muy elevado, por lo que hay que utilizar adhesivos especiales, como la poli-L-lisina^{120,199,266,268} y los derivados de organosilano²⁶⁹. Estos últimos son los que dan mejores resultados (prácticamente un 100% de adherencia).

3. Digestión enzimática del tejido:

El pretratamiento enzimático del tejido antes de realizar la hibridación es un punto clave para optimizar los resultados obtenidos con esta técnica, sobre todo si se emplea un fijador que produzca uniones entrecruzadas entre proteínas como el formol tamponado. La finalidad de esta digestión enzimática es permeabilizar el tejido y liberar al ADN de su unión a proteínas de manera que las sondas puedan alcanzar perfectamente sus secuencias diana.

Las dos enzimas más utilizadas son la pepsina, previa hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 0.1N, y la proteinasa K. Las concentraciones enzimáticas y los tiempos de incubación dependen del tipo de tejido estudiado y, en el caso de la proteinasa K, del tiempo de fijación con formol tamponado⁹⁶.

4. Hibridación:

Las sondas se emplean diluidas en una mezcla de hibridación de composición compleja. En ella se incluyen agentes que bloquean las uniones no específicas de las sondas al tejido, como la solución de Denhardt²⁷⁰, el dodecil sulfato sódico (SDS) y el ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado; sustancias como el sulfato de dextrano o el polietilén glicol, que aumentan la concentración efectiva de la sonda, acelerando la hibridación²⁷¹⁻²⁷³; formamida, en concentración variable según las condiciones en las que se quiera realizar la hibridación; y un tampón, normalmente tampón citrato salino (SSC), cuya concentración depende también de las condiciones en las que se quiere realizar la hibridación, aunque habitualmente se suelen emplear soluciones de alta fuerza iónica (6x SSC) para maximizar el apareamiento de la sonda con su secuencia diana.

Con el empleo de este tipo de mezclas de hibridación no es necesario realizar un paso previo de prehibridación, excepto en el caso de la hibridación ARN-ARN, sobre todo si se emplean sondas marcadas con ³⁵S, en cuyo caso sí conviene realizar una prehibridación para intentar minimizar el ruido de fondo.

Cuando se emplean sondas de ADN, una vez añadidas al tejido la desnaturalización de la sonda y del ADN del tejido se realiza calentando el portaobjetos en una placa calefactora a 95-100°C.

5. Lavado de posthibridación:

Este es un paso fundamental en el que se fijan las condiciones de "permissividad" de la técnica (condiciones relajadas o estrictas). Están implicados tres parámetros: fuerza iónica del tampón empleado en el lavado, concentración de formamida en el mismo y temperatura a la que se realiza.

6. Detección del dúplex sonda-secuencia diana:

El método de detección del híbrido va a depender del tipo de marcaje de la sonda empleada. En el caso de sondas marcadas radioactivamente los portaobjetos se recubren de una emulsión fotográfica. El tiempo de exposición depende del isótopo empleado en el marcaje (3-4 días para ^{35}S , 30 días para ^3H).

Cuando se emplean sondas marcadas con biotina la detección del dúplex se realiza con un complejo avidina-biotina-enzima más el correspondiente par sustrato/cromógeno, con lo que se obtiene una reacción coloreada. Las enzimas más utilizadas son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina.

En el caso de sondas marcadas con digoxigenina la detección del híbrido se realiza por métodos inmunohistoquímicos con un anticuerpo anti-digoxigenina.

La sensibilidad de la HIS es menor que la de las técnicas en filtro. Utilizando sondas marcadas con ^{35}S se estima alrededor de 50 copias de ADN de HPV/célula¹⁴⁹ y con sondas marcadas con ^3H alrededor de 5 copias/célula¹⁴⁴. Con sondas biotiniladas recientes estudios señalan que la sensibilidad de la HIS es similar o mejor a la obtenida con sondas marcadas con ^{35}S ^{274,275}.

A pesar de este inconveniente, la HIS presenta varias ventajas con respecto a las técnicas anteriores (tabla I.V), sobre todo cuando se emplea marcaje no radioactivo: permite la realización de estudios retrospectivos sobre material fijado en formol e incluido en parafina, da información sobre la localización de los ácidos nucleicos de HPV en el tejido y permite la detección de ADN de HPV en muestras que resultan negativas por Southern blot en las que hay sólo un número muy reducido de células infectadas con un número elevado de copias^{276,277}.

<u>TECNICA</u>	<u>SENSIBILIDAD</u>	<u>VENTAJAS</u>	<u>INCONVENIENTES</u>
Southern blot	0.1-0.01 copias/cél.	<ul style="list-style-type: none"> · Detección y tipado · Análisis de restricción 	<ul style="list-style-type: none"> · 10 µg de ADN celular · Sondas radioactivas · Material fresco · Largo (2-14 días) y laborioso
Dot blot	1 copia/cél.	<ul style="list-style-type: none"> · 500 ng de ADN celular · Análisis simultáneo de varias muestras · Técnicamente sencillo 	<ul style="list-style-type: none"> · Sondas radioactivas · Material fresco · Falsos positivos · Sólo tipado · Largo (1-4 días)
Reverse blot	1 copia/cel.	<ul style="list-style-type: none"> · Detección y tipado · 500 ng de ADN celular 	<ul style="list-style-type: none"> · Reacciones de marcaje individual para cada muestra · Marcaje radioactivo · Material fresco · Largo (varios días) y laborioso
Hibridación <i>in situ</i> en tejido	20-50 copias/cél.	<ul style="list-style-type: none"> · Correlación con hallazgos histológicos · Detección y tipado · Sondas no radioactivas · Material fresco o fijado · Estudios retrospectivos · Rápido (<1 día) · Técnicamente sencillo 	<ul style="list-style-type: none"> · Menor sensibilidad
Hibridación <i>in situ</i> en filtro	No establecida	<ul style="list-style-type: none"> · Análisis simultáneo de varias muestras · Técnicamente sencillo 	<ul style="list-style-type: none"> · Sondas radioactivas · Falsos positivos · Sólo tipado

Tabla I.V. Ventajas e inconvenientes de las principales técnicas diagnósticas de la infección genital por HPV basadas en hibridación de ácidos nucleicos.

I.4.5.6. Hibridación *in situ* en filtro.

Esta técnica se emplea para detectar secuencias de ADN de HPV en material procedente de una toma citológica cérvico-vaginal. Para realizarla, este material se coloca directamente en un filtro, el cual se trata adecuadamente para romper las células y desnaturalizar y neutralizar el ADN antes de realizar la hibridación^{109,154,155,192,278}.

Es una técnica muy similar al Dot blot, con la ventaja de que no es necesario extraer el ADN celular. Sin embargo, presenta los mismos inconvenientes que el Dot blot por lo que respecta a los falsos positivos. La sensibilidad estimada para esta técnica varía según los autores. Así, Caussy y cols.²⁷⁹ fueron capaces de detectar 100 células CaSki (células de un carcinoma cervical que contienen aproximadamente 500 copias de ADN de HPV 16/célula), mientras que Cornelissen y cols.²⁸⁰ no pudieron detectar menos de 10^5 células CaSki. Si se la compara con el Southern blot y el Dot blot, su sensibilidad es aproximadamente la tercera parte de la de estas técnicas^{109,279,280}, a pesar de modificaciones incluidas por algunos autores tratando de aumentarla²⁸¹.

I.4.5.7. Técnica sandwich.

Consiste en clonar dos fragmentos no solapantes del ADN de un tipo concreto de HPV, uno en el bacteriófago M13 y otro en el plásmido pBR322. El ADN de M13-HPV se inmoviliza en un filtro, mientras que el ADN de pBR322-HPV se marca radioactivamente. A continuación el filtro se incuba en condiciones de hibridación con una mezcla del ADN marcado y células rotas procedentes de una toma citológica cérvico-vaginal. Si en la muestra en estudio hay ADN del mismo tipo viral hibridará, por una parte, con el ADN de M13-HPV unido al filtro y, por otra parte, con el ADN de pBR322-HPV marcado. El ADN marcado que no ha hibridado se elimina con lavados y la radioactividad que permanece unida al filtro puede medirse rápidamente en un contador de centelleo. De esta forma, la

presencia de radioactividad unida al filtro implica la presencia de ADN del HPV en cuestión en la muestra^{282,283}.

La sensibilidad de la técnica se ha estimado en 1 a 5 veces mayor que la del Dot blot y presenta la ventaja de no requerir autorradiografía para detectar los híbridos, con la consiguiente ganancia de tiempo.

I.4.6. AMPLIFICACION DE ADN: REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de la terminología inglesa "polymerase chain reaction") es una técnica de muy reciente desarrollo^{284,285} que permite la amplificación de una secuencia concreta de ADN *in vitro*, siendo en la actualidad la de mayor sensibilidad para el diagnóstico de la infección por HPV. Se fundamenta en el empleo de dos pequeños oligonucleótidos, denominados cebadores o "primers", complementarios de las regiones que flanquean la secuencia que se quiere amplificar en cadenas opuestas. Estos cebadores se colocan en condiciones de hibridación con el ADN desnaturalizado extraído de una muestra en estudio, de manera que si en el ADN se encuentran presentes sus respectivas secuencias diana, se forman los correspondientes híbridos. En presencia de una ADN polimerasa y de nucleótidos trifosfato se produce la elongación de cada cadena en direcciones opuestas y solapantes sintetizándose nuevamente la secuencia que nos interesa. Repitiendo el ciclo de desnaturalización, hibridación de los cebadores a sus secuencias diana y elongación 30-40 veces se puede llegar a conseguir más de 1 μ g del fragmento específico de HPV que nos interesa. Esto es posible gracias al empleo de ADN polimerasas termoestables, siendo la más utilizada la Taq polimerasa, aislada del microorganismo *Thermus aquaticus*.

El producto amplificado es fácilmente detectable mediante electroforesis en gel, sugiriendo la presencia de HPV en las muestras en estudio. La confirmación

requiere transferir el ADN a un filtro y realizar una hibridación con una sonda específica del HPV que se considera.

La PCR se puede realizar también a partir de tejido fijado en formol e incluido en parafina, sin extracción previa del ADN²⁸⁶, por lo que permite realizar estudios retrospectivos. Su sensibilidad es tan elevada que permite detectar una copia de ADN de HPV en 10^5 células^{72,287}.

Su principal inconveniente deriva precisamente de su gran sensibilidad, ya que cualquier contaminación, por pequeña que sea, al amplificarse da lugar a falsos positivos. Esta contaminación puede proceder de los propios productos de amplificación generados por la PCR y de los plásmidos portando secuencias de HPV utilizadas como sondas en las técnicas de hibridación²⁸⁸. Varios autores han descrito protocolos para intentar evitar las contaminaciones^{288,289}, pero aún así es muy difícil evitarlas por completo²⁹⁰.

Todo esto, unido a la falta de estandarización en las condiciones en que se realiza la PCR en lo que respecta a cebadores, polimerasas, mezclas de reacción, etc., hace que los resultados publicados en varios países por diversos autores sean contradictorios^{287,291-303}.

II. OBJETIVOS

Las lesiones genitales relacionadas con HPV constituyen un campo en el que la biología molecular ha tenido un gran impacto a muchos niveles. Estudios de transformación celular⁴⁹⁻⁵⁶, expresión génica⁸³⁻⁹⁶ y organización del genoma^{89,93} han ligado el HPV a procesos neoplásicos y han aportado datos que sugieren rutas potenciales a través de las cuales el genoma viral ejercería su efecto en las células. Estudios epidemiológicos con material clínico han permitido definir perfiles de población de riesgo⁶⁸ y han asociado tipos específicos de HPV con neoplasias. Con la tecnología de proteínas de fusión^{94,226-228} se está produciendo una batería de anticuerpos contra proteínas virales específicas, que en un futuro próximo facilitarán mapear su distribución en los tejidos infectados y clarificar la respuesta inmune del paciente a la infección por HPV. Aunque todos estos estudios multidisciplinarios ayudan a comprender la infección genital por HPV y a clarificar el papel de este virus en el desarrollo y evolución de neoplasias, **no se ha establecido todavía la utilidad clínica de esta información.**

Por otro lado, estudios de seguimiento a largo plazo demuestran que sólo un porcentaje de lesiones asociadas a HPV progresan. Yliskoski y cols.³⁰⁴, en un reciente trabajo, señalan que, en general, el 56.7% de lesiones asociadas a HPV regresan, el 24.5% persisten y el 16.5% progresan. Estos valores varían según el grado de la lesión y el tipo de HPV que la origina y, probablemente, dependen de la respuesta inmune del paciente y de una serie de cofactores^{100,305-308}. Aunque son importantes para comprender el potencial biológico de displasias y neoplasias, **estas estadísticas no ofrecen ninguna información al patólogo**, quien con frecuencia debe evaluar un caso estudiando una o dos muestras citológicas y una única biopsia con técnicas de tinción convencionales.

Ante una lesión con potencialidad de evolución maligna, **los clínicos demandan el máximo de información** para tomar la decisión terapéutica más adecuada. La inmunohistoquímica permite confirmar la presencia de HPV en un tejido al detectar antígenos de la cápside del virus. La hibridación *in situ* posibilita la detección del tipo concreto de HPV asociado a una lesión o, por lo menos, su inclusión en un grupo de riesgo con respecto a la carcinogénesis. **En España esta técnica está poco desarrollada y los datos de que se disponen son muy**

escasos.

Con este trabajo, hemos pretendido obtener la máxima información de una biopsia ginecológica combinando técnicas propias de un laboratorio de anatomía patológica, algunas clásicas, como la observación microscópica de preparaciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina y la inmunohistoquímica, y otras de reciente incorporación, como la hibridación *in situ*.

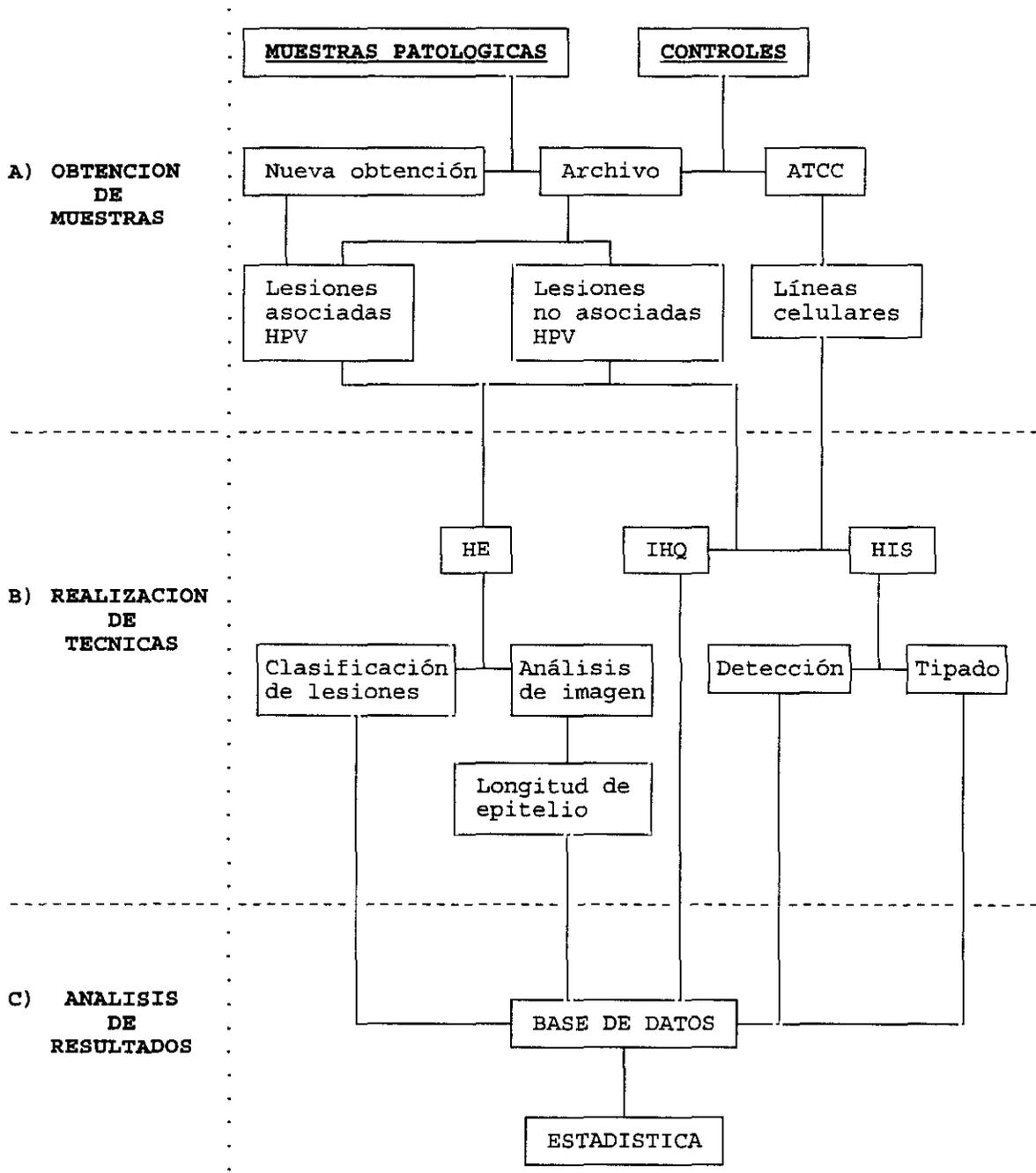
Por todo ello nos planteamos en el presente trabajo los siguiente objetivos:

1. Comprobar la utilidad de la inmunohistoquímica como técnica diagnóstica de la infección genital por HPV.
2. Establecer el tamaño más adecuado de una biopsia genital para minimizar el número de falsos negativos por hibridación *in situ*.
3. Comprobar la utilidad de la hibridación *in situ* como técnica diagnóstica de la infección genital por HPV.
4. Estudiar la distribución de los grupos de HPV de bajo riesgo, riesgo intermedio y alto riesgo de carcinogénesis en lesiones genitales benignas, lesiones con potencialidad de evolución maligna y lesiones malignas.
5. Realizar un estudio comparativo entre inmunohistoquímica e hibridación *in situ*.
6. Estudiar las características morfológicas de la hibridación *in situ* con fines pronósticos.
7. Desarrollar nuevas técnicas que combinen inmunohistoquímica e hibridación *in situ* y que aporten mayor información al estudio de la infección genital por HPV.

III. MATERIAL Y METODOS

III.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para conseguir los objetivos mencionados en el capítulo anterior se diseñó la siguiente metodología experimental, dividida en tres fases:



ATCC: American Type Culture Collection.
 HE : Hematoxilina-eosina.
 IHQ : Inmunohistoquímica.
 HIS : Hibridación in situ.

III.2. MATERIAL.

III.2.1. BIOPSIAS GENITALES.

Se han estudiado un total de 244 biopsias de tracto genital inferior femenino: 40 de vulva y 204 de cérvix uterino, tanto de archivo como de nueva obtención, procedentes de los siguientes centros:

A) Muestras de archivo:

- Archivo de Anatomía Patológica de la Residencia de la Seguridad Social Nuestra Señora de Sonsoles de Avila (años 1978-1990).
- Archivo de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Salamanca (años 1982-1992).

B) Muestras de nueva obtención:

- Centro de Orientación Familiar (COF) de Guadalajara.
- Centro Penitenciario Femenino (CPF) de Madrid.
- Centros de Salud del Ayuntamiento de Madrid.

La distribución de muestras por su procedencia se especifica en la tabla III.1. y en las figuras III.1 y III.2.

	<u>VULVA</u>	<u>CERVIX</u>	<u>TOTAL</u>
Salamanca	13	48	61
Avila	14	71	85
Guadalajara	3	29	32
CPF Madrid	10	40	50
Ayuntamiento Madrid	--	16	16
T O T A L	40	204	244

(CPF: Centro Penitenciario Femenino)

Tabla III.1. Distribución de las biopsias estudiadas según su procedencia y localización anatómica.

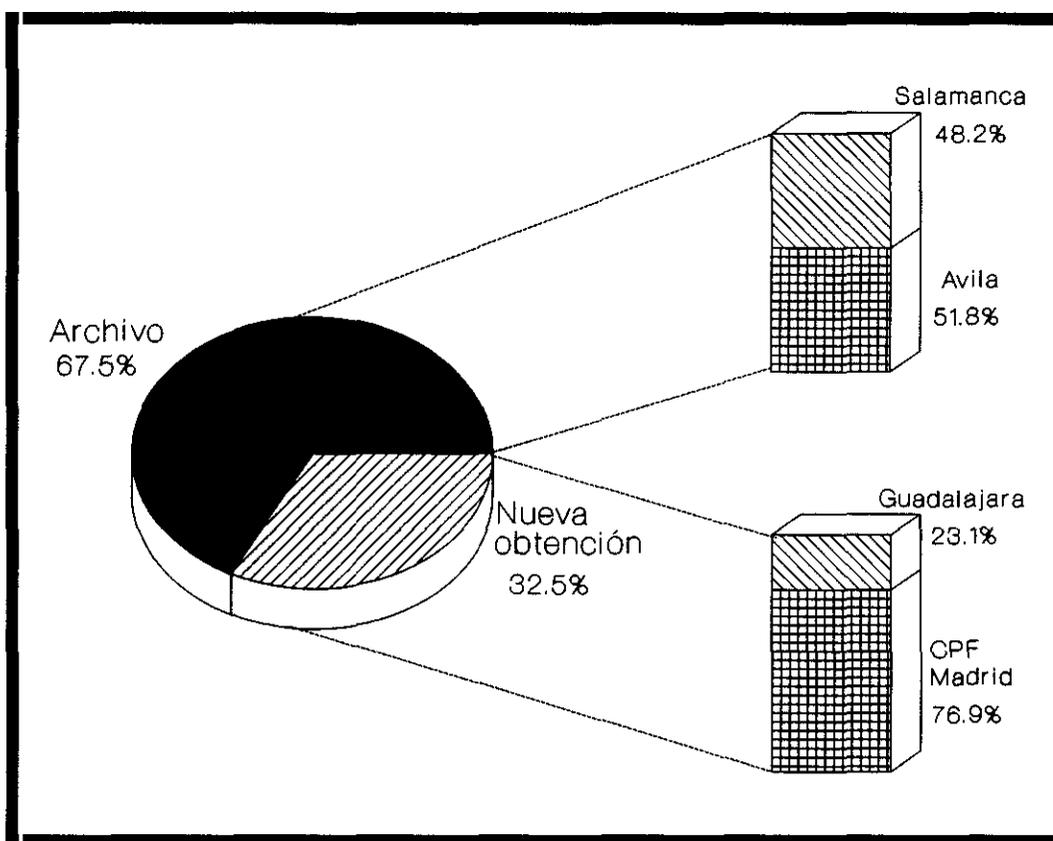


Figura III.1. Distribución porcentual de las biopsias de vulva según su procedencia (n=40).

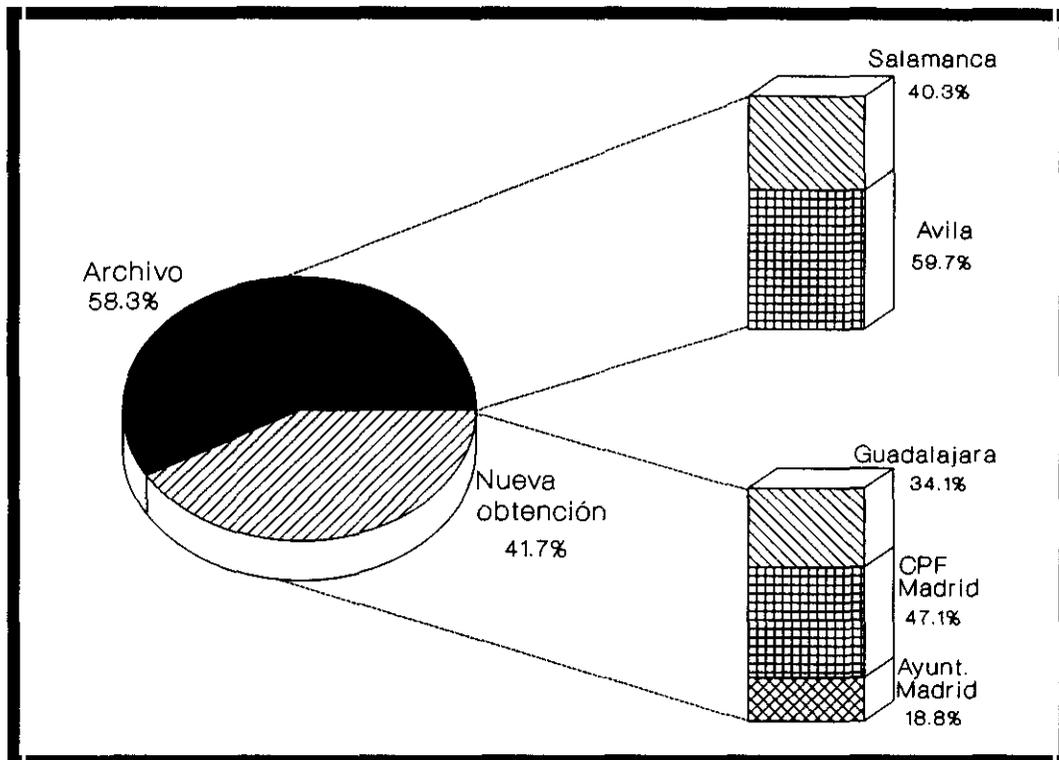


Figura III.2. Distribución porcentual de las biopsias de cérvix uterino según su procedencia (n=204).

III.2.1.1. Biopsias de archivo.

Las piezas de archivo se obtuvieron tras revisar los correspondientes archivos de diagnósticos. Se eligieron aquellas biopsias genitales diagnosticadas como condilomas, displasias, neoplasias intraepiteliales y carcinomas. Del archivo del Hospital Clínico Universitario de Salamanca se escogieron, además, 24 biopsias correspondientes a lesiones no asociadas a HPV.

Todas las piezas elegidas se recuperaron en forma de bloques de parafina, asegurándonos previamente de que en ambos Centros y durante los años revisados las biopsias ginecológicas fueron fijadas en formol tamponado.

Se obtuvieron cortes de 7 μm y se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina, a fin de reclasificar las lesiones asociadas a HPV según el sistema de

Bethesda, o para confirmar el diagnóstico de las lesiones cervicales no asociadas a HPV. Estas últimas se clasificaron en pólipos cervicales, hiperqueratosis y cervicitis crónica, según los siguientes criterios:

1. **Pólipo cervical:** Lesión sobreelevada con pedículo, tapizada en superficie por epitelio escamoso, con estroma fibrovascular.
2. **Hiperqueratosis:** Aumento de la capa de queratina en el epitelio cervical.
3. **Cervicitis crónica:** Alteración inflamatoria de la zona de transición exo-endocervical con infiltrado de linfocitos y células plasmáticas.

III.2.1.2. Biopsias de nueva obtención.

Las biopsias nuevas se obtuvieron de pacientes con resultados citológicos previos compatibles con lesiones asociadas a HPV. La toma se realizó, bajo examen colposcópico, de las zonas sospechosas y las piezas fueron fijadas en formol tamponado e incluidas en parafina por métodos rutinarios.

Se estudiaron preparaciones de todas las biopsias teñidas con la técnica de hematoxilina-eosina y a continuación se clasificaron las muestras por diagnósticos.

Las lesiones cervicales no invasivas asociadas a HPV se clasificaron según el sistema de Bethesda (LSIL y HSIL), de acuerdo con los criterios de Crum y Nuovo⁹⁶, con una modificación: los condilomas acuminados se consideraron como un grupo independiente no incluido en las LSIL. Las lesiones de vulva se clasificaron según la terminología VIN (VIN I, VIN II y VIN III). En todos los casos, el diagnóstico de compatibilidad con infección por HPV se basó en la observación de coilocitosis junto con dos de las siguientes características histológicas:

binucleación y/o multinucleación, disqueratosis, papilomatosis y contorno nuclear irregular¹¹⁸.

Los carcinomas invasivos se clasificaron según el grado de diferenciación en bien diferenciados, moderadamente diferenciados y pobremente diferenciados, de acuerdo con los criterios de Kurman y cols.¹⁷⁹.

III.2.2. LINEAS CELULARES.

A fin de comprobar la sensibilidad y especificidad de la técnica de hibridación in situ se utilizaron tres líneas celulares establecidas con distinto número de copias de genoma de HPV integrado en su propio genoma:

1. **Células CaSki**, obtenidas a partir de un carcinoma epidermoide de cérvix, con 400-600 copias integradas del genoma de HPV tipo 16³⁰⁹⁻³¹¹.
2. **Células HeLa 229**, obtenidas a partir de un carcinoma epidermoide de cérvix, con 10-50 copias integradas del genoma de HPV tipo 18^{83,311}.
3. **Células SiHa**, obtenidas a partir de un carcinoma escamoso de cérvix, con 1-2 copias integradas del genoma de HPV tipo 16^{310,311}.

Las tres líneas celulares fueron enviadas por la "American Type Culture Collection (ATCC)" en viales congelados.

III.3. METODOS.

Una vez clasificadas las biopsias por lesiones, el procesamiento de todas ellas fue similar:

Se colocaron cortes de 5 μ m de espesor en portaobjetos pretratados con

poli-l-lisina o derivados del silano, y se realizaron las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* para detectar el antígeno estructural común de HPV y secuencias de ADN específicas de HPV, respectivamente.

Los cortes teñidos con hematoxilina-eosina de todas las biopsias, excepto las correspondientes a lesiones invasivas, fueron sometidas a un estudio por análisis de imagen para medir la longitud del epitelio presente en la muestra.

Finalmente, se realizaron técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica sobre extensiones de las tres líneas celulares estudiadas, a fin de comprobar la sensibilidad y especificidad de las técnicas utilizadas.

III.3.1. PRETRATAMIENTO DE LOS PORTAOBJETOS.

Los portaobjetos usados en las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* fueron pretratados con poli-l-lisina o derivados del silano, como adhesivos, para conseguir una buena adherencia de los cortes e impedir que se despegasen durante las sucesivas incubaciones a las que iban a ser sometidos.

A) Poli-l-lisina:

Una vez desengrasados y limpios por inmersión en una mezcla al 50% de alcohol/éter, los portaobjetos se sumergieron en una solución acuosa de poli-l-lisina (Sigma) al 0.02% durante 10 minutos a temperatura ambiente (t.a.). A continuación se lavaron con agua destilada, se dejaron secar al aire y se almacenaron en cajas con desecadores a -20°C hasta su utilización.

B) Derivados del silano:

Se empleó el adhesivo comercial BIOBOND (BioCell Research

Laboratories) diluido al 2% en acetona. Los portaobjetos se sumergieron durante 4 minutos en esta solución y después se lavaron durante 5 minutos con agua destilada. Una vez secos se almacenaron en cajas con desecadores a temperatura ambiente hasta su utilización.

En ambos casos, las preparaciones se incubaron a 56°C durante 24 horas para conseguir una gran adhesividad.

III.3.2. CULTIVO Y PROCESAMIENTO DE LAS LINEAS CELULARES.

Las células enviadas por la ATCC se descongelaron en baño maría a 37°C, se contaron en cámara de Neubauer y se estudió su viabilidad utilizando una solución de azul tripan al 5%. A continuación se cultivaron en frascos de 25 cm² a una concentración de 500.000 células viables/ml a 37°C con un 5% de CO₂. Los medios de cultivo utilizados con cada línea celular fueron los siguientes:

1. Células CaSki: RPMI 1640.
2. Células HeLa 229: Medio mínimo esencial (Eagle) con aminoácidos no esenciales y piruvato sódico.
3. Células SiHa: Medio mínimo esencial (Eagle) con aminoácidos no esenciales y tampón borato salino con albúmina bovina (BBS) de Earle.

Todos los medios de cultivo fueron suplementados con un 10% de suero bovino fetal y antibióticos (7.5 UI/ml de penicilina y 7.5 µg/ml de estreptomicina).

A los cuatro días de cultivo se procedió al cambio de medio y a los 7-8 días, una vez formada una monocapa de células, se realizaron pases. Para ello se trataron las células con tripsina al 0.25% en solución de HANK (Flow

Laboratories) durante 10 minutos a 37 °C. Después de despegadas, las células se lavaron con medio de cultivo fresco, sin aditivos, se contaron en cámara de Neubauer y se pusieron nuevamente en cultivo a una concentración de 500.000 células viables/ml.

Después de tres semanas de cultivo (2 pases) se cosecharon las células por tripsinización. Parte de ellas se alicuotaron en viales de 1 ml, diluidas a una concentración de 5×10^6 células/ml en un medio para congelación de células con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (JRH Biosciences). Las células restantes se lavaron con tampón fosfato salino (PBS), se extendieron en portaobjetos pretratados, se dejaron secar a temperatura ambiente y se fijaron por inmersión en alcohol/acetona al 50% durante 10 minutos a 4 °C. Después se dejaron secar nuevamente y se guardaron en bolsas herméticas con un desecador hasta la realización de las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación in situ.

III.3.3. ANALISIS DE IMAGEN.

Se midió la longitud del epitelio escamoso a nivel de la capa basal de células en todas aquellas biopsias en las que dicha capa celular estaba conservada (biopsias con lesiones no invasivas). Para ello se utilizó un analizador de imagen IMCO 10 (Kontron Bildanalyse) junto con el programa informático MIP (de la terminología inglesa "Microm Image Processing") (Microm España) como software.

Para realizar las medidas se captaron las imágenes microscópicas de las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina, observadas con el objetivo 20x, mediante una cámara de TV color (Hitachi, KP-C503) conectada directamente al microscopio. Estas imágenes se digitalizaron en una matriz de 512 x 512 puntos o "pixels" (de la terminología inglesa "picture element"). A continuación se trazó de forma interactiva una línea siguiendo la capa basal de células del epitelio presente en la imagen, calculándose automáticamente la distancia entre los

extremos y el camino recorrido (fig. III.3).

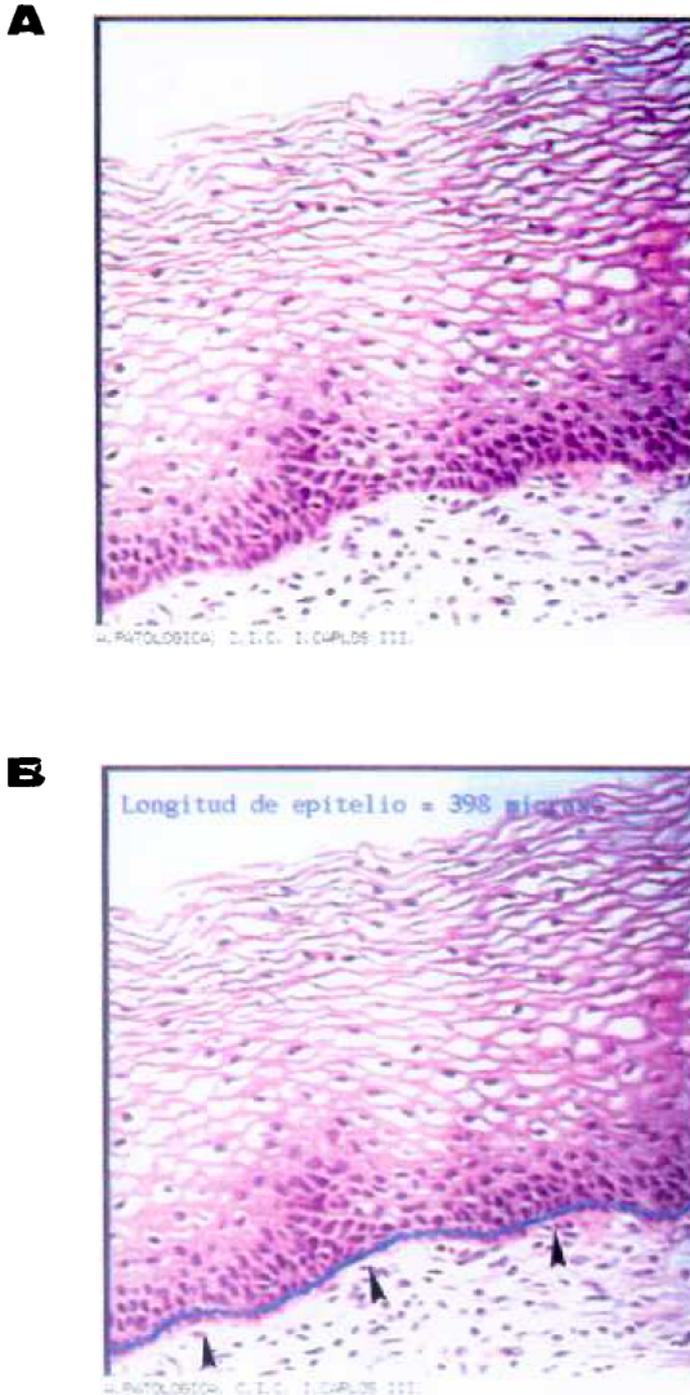


Figura III.3. Medida de la longitud del epitelio presente en una biopsia.

A) Imagen digitalizada correspondiente a una biopsia de cérvix diagnosticada de LSIL.
B) Sobre la imagen anterior se ha trazado de forma interactiva una línea siguiendo la capa basal del epitelio, de forma que el programa utilizado calcula automáticamente el camino recorrido en micras.

Antes de realizar las medidas se calibró todo el sistema con un portaobjetos calibrado (Leitz) para que el resultado final de las medidas fuese expresado en milímetros.

Después de realizar todas las medidas las biopsias se agruparon según la longitud de su epitelio en clases de 1 mm de amplitud, desde una longitud inferior a 2 mm hasta una longitud mayor de 10 mm.

III.3.4. INMUNOHISTOQUIMICA.

La técnica se realizó con un equipo comercial de inmunohistoquímica ("Ultraprobe Universal Kit", Biomedica Corp.) basado en el método avidina-biotina-fosfatasa alcalina, que emplea un anticuerpo secundario polivalente biotinilado.

Como anticuerpo primario se empleó un anticuerpo policlonal de conejo prediluido anti-PV (Biogenex Laboratories), obtenido inmunizando conejos con virus del papiloma bovino tipo 1 (BPV 1). Este anticuerpo da reacción cruzada con todos los virus del papiloma.

Todas las incubaciones se efectuaron en una estación de trabajo para inmunohistoquímica "MicroProbe" (Biomedica Corp.), basada en el principio de "transporte capilar de reactivos"³¹². Se trata de un sistema vertical de inmunohistoquímica, en el que los portaobjetos con la muestra se colocan enfrentados dos a dos, paralelos y verticalmente, con un pequeño espacio entre ambos por el que ascienden por capilaridad los distintos reactivos. Estos se eliminan después de cada incubación apoyando los portaobjetos sobre papeles de filtro.

Para el desarrollo de la técnica se siguió el siguiente protocolo, recomendado por el fabricante del equipo con ligeras modificaciones:

A) Preparación de la muestra:

- Incubar las preparaciones a 65°C durante 10 minutos para fundir la parafina.
- Desparafinar con Histolemon (4 x 1 minuto, t.a.).
- Rehidratar con alcohol absoluto (2 x 1 minuto, t.a.), alcohol de 96% (2 x 1 minuto, t.a.) y tampón de lavado pH 7.5 ("Immunoassay buffer", Biomedica Corp.) (2 lavados).

En el protocolo del equipo se recomienda utilizar una solución de lugol y ácido clorhídrico en alcohol de 95% en lugar de alcohol de 96%, pero en este caso no es necesario por no haberse utilizado fijadores que contengan mercurio.

En el caso de las líneas celulares, la técnica se inicia en este punto, lavando varias veces con el tampón de lavado.

- Bloquear la fosfatasa alcalina endógena con una solución de ácido crómico al 1% ("Redusol", Biomedica Corp.) (1 x 2 minutos a 40°C).
- Lavar con tampón (4 lavados).

B) Formación del complejo antígeno-anticuerpo:

- Anticuerpo anti-PV, 20 minutos a 40°C, en lugar de los 9 minutos recomendados por el fabricante del equipo.
- Lavar con tampón (2 lavados).

C) Detección del complejo antígeno-anticuerpo:

- Anticuerpo secundario polivalente biotinilado, 4 minutos a 40°C.

- Lavar con tampón (2 lavados).
- Avidina-fosfatasa alcalina, 4 minutos a 40°C.
- Lavar con tampón (2 lavados).
- Naftol fosfato (sustrato)/Fast red (cromógeno), 15 minutos a 40°C, en lugar de dos incubaciones de 10 minutos como recomienda el fabricante.
- Lavar con agua destilada (2 lavados).

D) Coloración de contraste y montaje de las preparaciones:

Para la realización de esta fase de la técnica no se siguió el protocolo ni se utilizaron los reactivos del equipo mencionado.

- Hematoxilina de Harris (Gurr), 1-4 minutos a t.a.
- Diferenciar con agua amoniacal, 15 segundos a t.a.
- Lavar con agua.
- Montar con glicerol-gelatina, previamente calentado a 60°C.

El resultado final es una coloración rojo brillante en los núcleos de las células positivas sobre un fondo de tonalidad azul muy clara debida a la tinción de contraste.

Por cada muestra se procesó simultáneamente un control negativo en el que el anticuerpo primario anti-PV se sustituyó por suero normal de conejo. Por cada serie se procesó un control positivo, utilizando cortes de una biopsia positiva por inmunohistoquímica para HPV.

Una biopsia se consideró positiva por inmunohistoquímica para el antígeno estructural común de HPV cuando se observó por lo menos un núcleo claramente positivo correspondiente a una célula del tercio superior del epitelio.

III.3.5. HIBRIDACION *IN SITU*.

Se realizaron dos técnicas distintas de hibridación *in situ* para detectar secuencias de ADN específicas de HPV:

1. **Técnica de detección (HIS-detección)**, realizada en condiciones relajadas de hibridación, para demostrar la presencia de secuencias de HPV en el tejido, sin especificar el tipo. Esta técnica se efectuó en todas las biopsias y en las tres líneas celulares.
2. **Técnica de tipado (HIS-tipado)**, realizada en condiciones estrictas de hibridación, para detectar secuencias específicas de los principales tipos de HPV genitales. Esta técnica se aplicó sólo a aquellas biopsias que dieron un resultado positivo por la técnica de detección y a las tres líneas celulares estudiadas.

III.3.5.1. Técnica de detección.

Se empleó un equipo comercial ("panHPV DISH kit", Kreatech Biotechnology), diseñado para la detección de ADN de HPV en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, en tejidos congelados y en muestras citológicas.

El equipo se basa en el empleo de un cóctel de sondas de ADN biotiniladas específicas de los principales tipos de HPV genitales en condiciones de hibridación relajadas, lo que permite detectar tanto secuencias de ADN de los tipos incluidos en el cóctel de sondas, como secuencias relacionadas. La

detección del híbrido sonda biotinilada-ADN diana se basa en el método estreptavidina-biotina-fosfatasa alcalina.

Para el desarrollo de la técnica se siguió el protocolo que se describe a continuación, que coincide con el recomendado por el fabricante, salvo algunas modificaciones que se señalan:

A) Preparación de la muestra:

- Desparafinar los cortes con Histolemon (3 x 15 minutos, t.a.).
- Rehidratar con alcohol absoluto (2 x 1 minuto, t.a.), alcohol de 90% (1 minuto, t.a.), alcohol de 70% (1 minuto, t.a.), alcohol de 50% (1 minuto, t.a.) y PBS pH 7.4 (5 minutos, t.a.).

En el caso de las líneas celulares, la técnica se inició en este punto, lavándolas en PBS pH 7.4 (3 x 3 minutos, t.a.).

- Digestión enzimática con pepsina/HCl:
 - a) Biopsias:
0.25% de pepsina en HCl 0.01 N durante 30 minutos a 37°C,
previa hidrólisis ácida con HCl 0.1 N durante 15 minutos a t.a.
 - b) Líneas celulares:
10 µg/ml de pepsina en HCl 0.01 N durante 10 minutos a 37°C.
- Deshidratar con alcohol de 50% (1 minuto, t.a.), alcohol de 70% (1 minuto, t.a.), alcohol de 90% (1 minuto, t.a.) y alcohol absoluto (2 x 1 minuto, t.a.) y dejar secar los portos al aire.

B) Hibridación:

- Incorporar la sonda (10 μ l) sobre cada corte y colocar encima un cubreobjetos, evitando la formación de burbujas.
- Desnaturalizar la sonda y el ADN del tejido por calentamiento, colocando las preparaciones sobre una placa calefactora a 95°C durante 5 minutos, en lugar de los 2 minutos a 90°C recomendados por el fabricante.
- Hibridar en estufa a 37°C durante 1 hora, en lugar de los 30 minutos recomendados por el fabricante.
- Retirar los cubreobjetos por inmersión en PBS pH 7.4 y efectuar los lavados de posthibridación con tampón citrato salino (1.5 mM de citrato, 15 mM de NaCl) sin formamida (3 x 5 minutos a 37°C).
- Lavar con PBS (2 x 2 minutos, t.a.).

C) Detección del híbrido:

- Retirar el exceso de tampón y añadir una solución de estreptavidina (0.8 μ g/ml) en PBS pH 7.4 + 3% de albúmina bovina (BSA) (30 minutos, t.a.).
- Lavar con PBS (2 x 3 minutos, t.a.).
- Retirar el exceso de tampón y añadir una solución de fosfatasa alcalina biotinilada (0.4 μ g/ml) en PBS pH 7.4 + 3% de BSA (30 minutos, t.a.).
- Lavar con PBS (2 x 3 minutos, t.a.).
- Retirar el exceso de tampón y añadir una solución de bromo-cloro-

indol fosfato (BCIP; sustrato) y azul de nitrotetrazolio (NBT; cromógeno) preparada de la siguiente forma: añadir 10 μ l de una solución de NBT (32 mg/ml) en dimetilformamida (DMF) al 70% + 10 μ l de una solución de BCIP (16 mg/ml) en DMF a 1 ml de tampón de tinción (TRIS-HCl 0.1 M pH 9.5, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl₂).

- Incubar en oscuridad a t.a., controlando con el microscopio la reacción de tinción, y nunca más de 2 horas. En nuestro experimento se obtuvieron buenos resultados con 30 minutos de incubación.
- Parar la reacción lavando los portaobjetos con grandes cantidades de PBS y a continuación con agua destilada.

D) Coloración de contraste y montaje de las preparaciones:

En esta fase de la técnica no se siguió el protocolo ni se utilizaron los reactivos del equipo mencionado. Se realizaron los mismos pasos descritos en la técnica de inmunohistoquímica.

El resultado final es una coloración violácea a negra en los núcleos de las células positivas sobre un fondo de tonalidad azul muy clara.

Por cada muestra se procesaron simultáneamente tres cortes: uno se trató con el cóctel de sondas biotiniladas; un control negativo, en el que la sonda específica para HPV fue sustituida por una sonda biotinilada específica para el plásmido pBR322; y un control positivo, en el que se utilizó una sonda específica de ADN humano (secuencia Alu 2, Biomedica Corp.).

Por cada serie se procesó un control positivo consistente en cortes de una biopsia en la que previamente se había confirmado la presencia de ADN de HPV.

Una biopsia se consideró positiva para HPV por HIS-detección cuando se observó por lo menos un núcleo claramente positivo.

III.3.5.2. Técnica de tipado.

Se utilizó el equipo comercial "PathoGene" (Enzo Diagnostics), diseñado para la detección de ADN de tipos de HPV de bajo riesgo (6 y 11), riesgo intermedio (31,33 y 51) y alto riesgo (16 y 18), en biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina. Concretamente se utilizaron tres sondas biotiniladas:

1. Cóctel de dos sondas de ADN biotiniladas específicas para los tipos 6 y 11 de HPV.
2. Cóctel de dos sondas de ADN específicas para los tipos 16 y 18 de HPV.
3. Cóctel de tres sondas de ADN específicas para los tipos 31, 33 y 51 de HPV.

A diferencia de la técnica de detección, la hibridación se realizó en condiciones estrictas, de manera que sólo se pudieran detectar las secuencias de ADN complementarias de las utilizadas en las sondas. La detección del híbrido se realizó por el método estreptavidina-biotina-peroxidasa.

A continuación se detalla el protocolo seguido para la realización de la técnica, que coincide con el recomendado por el fabricante del equipo, salvo pequeñas modificaciones que se señalan:

A) Preparación de la muestra:

- El desparafinado y la rehidratación de los cortes es igual al de la técnica de detección, excepto que se termina en agua destilada en lugar de PBS pH 7.4.
- Retirar el exceso de agua y dejar secar los cortes a t.a.

- Digestión enzimática con una solución de proteinasa K (250 $\mu\text{g/ml}$) en tampón de lavado (10 mM PBS, 5 mM EDTA) (15 minutos a 37°C).
- Lavar con tampón de lavado (3 x 1 minuto, t.a.).
- Bloqueo de peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en tampón de lavado (10 minutos a 37°C).
- Lavar con tampón de lavado (1 minuto, t.a.).
- Deshidratar los cortes, igual que en la técnica de detección, y dejarlos secar al aire.

B) Hibridación:

- Añadir 40 μl de cada sonda a sendos cortes y colocar encima un cubreobjetos, evitando la formación de burbujas.

En el caso de las líneas celulares, la técnica se inició directamente en este punto.

- Desnaturalizar la sonda y el ADN del tejido por calentamiento a 92°C durante 8 minutos en placa calefactora.
- Hibridar en estufa a 37°C durante 1 hora, en lugar de los 30 minutos recomendados por el fabricante.
- Retirar los cubreobjetos por inmersión en tampón de lavado y realizar un lavado de posthibridación con el tampón salino suministrado en el equipo, con un 50% de formamida (10 minutos a 37°C).
- Lavar con tampón de lavado (3 x 1 minuto, t.a.)

C) Detección del híbrido:

- Retirar el exceso de tampón e incubar con la solución de estreptavidina-peroxidasa biotinilada incluida en el equipo (15 minutos a 37°C).
- Lavar con tampón de lavado (3 x 1 minuto, t.a.).
- Retirar el exceso de tampón e incubar con una solución al 2% de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC, cromógeno) en tampón acetato con 0.03% de peróxido de hidrógeno (sustrato) (15 minutos a 37°C).
- Lavar con tampón de lavado (3 x 1 minuto, t.a.) y agua destilada.

D) Coloración de contraste y montaje de las preparaciones:

Se siguió el mismo protocolo que en las técnicas anteriores.

El resultado final es una coloración roja de intensidad variable en los núcleos de las células positivas, sobre un fondo azul muy claro.

Por cada muestra se procesaron simultáneamente 5 cortes: uno para cada sonda de ADN de HPV, más los controles negativo y positivo descritos en la técnica de detección.

Por cada serie se procesó, como control positivo, un corte de un tejido en el que previamente se había confirmado la presencia de un tipo concreto de HPV.

Una biopsia se consideró positiva por hibridación *in situ* para un grupo de riesgo determinado de HPV cuando se observó por lo menos un núcleo claramente positivo en el corte incubado con la sonda correspondiente.

En todas las biopsias positivas, y con el fin de estudiar posibles parámetros con implicaciones pronósticas, se tuvieron en cuenta el tipo de marcaje obtenido, la distribución en el epitelio de las células positivas y la presencia o ausencia de

células positivas en los tercios superior, medio e inferior del epitelio.

III.3.6. DETECCION SIMULTANEA DE ANTIGENOS Y SECUENCIAS DE ADN ESPECIFICAS DE HPV.

A fin de obtener la máxima información de cada muestra se procedió al desarrollo y puesta a punto de una técnica de doble marcaje combinando inmunohistoquímica e hibridación in situ, para detectar simultáneamente antígenos de la cápside del virus y secuencias de ADN específicas de HPV.

La técnica se realizó sobre cortes de 5 μm montados en portaobjetos pretratados con un adhesivo no catiónico derivado del silano ("Biobond", BioCell Research Laboratories) y se utilizaron secuencialmente el anticuerpo y las sondas utilizadas en las técnicas de inmunohistoquímica y de HIS-tipado para HPV, respectivamente.

Dado que es un técnica de diseño propio, a continuación se describe pormenorizadamente:

A) Inmunohistoquímica:

- Desparafinar y rehidratar los cortes con alcoholes de graduación decreciente hasta agua.
- Bloqueo de uniones inespecíficas con suero normal de cabra (BioCell Research Laboratories) (20 minutos, t.a.).
- Retirar el exceso de suero de cabra e incubar con anticuerpo policlonal de conejo prediluido anti-PV (Biogenex Laboratories) (30 minutos, t.a.).
- Lavar con tampón de lavado (0.1M Tris, 0.15M NaCl, 1% BSA, 0.1%

tween 20, 0.01% gelatina, pH=8.2) (3 x 5 minutos, t.a.).

- Incubar con anticuerpo secundario de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado con partículas de oro coloidal de 5 nm (BioCell Research Laboratories), diluido 1/50 en tampón de lavado (20 minutos, t.a.).
- Lavar con agua destilada en agitación (5 x 5 minutos, t.a.).
- Incubar con solución amplificadora de plata (BioCell Research Laboratories) a temperatura ambiente. El tiempo de amplificación se controla directamente por observación al microscopio, hasta obtener una coloración negra sin depósito inespecífico de plata. En nuestro caso este tiempo osciló alrededor de los 12 minutos.
- Lavar con abundante agua destilada.

A continuación se procede a realizar la técnica de hibridación *in situ* sobre estas mismas preparaciones.

B) Hibridación in situ:

Se utilizaron los mismos reactivos que en la técnica de tipado, y se siguió el mismo protocolo ya descrito, empezando por dejar secar los cortes a temperatura ambiente para realizar a continuación la digestión enzimática con proteinasa K.

Por cada muestra se procesó simultáneamente un control negativo que fue tratado con suero normal de conejo y una sonda de ADN biotinilada específica del plásmido pBR322.

III.2.7. ESTADISTICA.

Los hallazgos histopatológicos y los resultados de las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* se recogieron en un fichero de datos generado desde el programa dbase III plus y se analizaron con los paquetes estadísticos EPIINFO y EPISTAT. Se realizaron los siguientes estudios:

- Cálculo de porcentajes, siempre que el total fuese igual o superior a 6.
- Cálculo de la sensibilidad y especificidad de la inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en condilomas acuminados de cérvix uterino, así como de los valores predictivos positivo y negativo.
- Contraste de independencia entre dos variables mediante el análisis de tablas de contingencia (N x N) con el test de χ^2 . fijando el nivel de significación mínimo con unos límites de confianza del 95% , que corresponde a un valor de $p \leq 0.05$.
- Para estudiar las diferencias entre los distintos tipos de lesión los datos se agruparon en tablas de contingencia de 2 x 2 y se calculó el valor de χ^2 , aplicando la corrección de Yates en los casos necesarios, la razón de ventaja de riesgo u "Odds ratio" (OR), el intervalo de confianza de la OR de Cornfield al 95%, el riesgo relativo (RR) y el intervalo de confianza del RR al 95% según las series de Taylor.

ABRIR CAPÍTULO IV

