



Ginecología y Obstetricia

© Sociedad Peruana de Obstetricia y Ginecología

Ginecol. obstet. 1991; 37 (11): 69-72

IDENTIFICACIÓN DE PAPILOMA VIRUS EN CANCER DE CERVIX RECIENTEMENTE POSRADIOTERAPIA

Drs. Carlos Santos, Cariso Castellano, Robert Holloway, Michael Farrell, Oscar Barriga, Ricardo Galdos, Willard Barnes, Bennett Jenson, Graciela Ramírez, Gregorio Delgado.

CONDESATION

Using in situ hybridization, human papillomavirus type 16 was identified in both primary and recurrent cervical carcinoma following radiation therapy.

INTRODUCCIÓN

Se ha postulado que el papilomavirus humano (PVH) jugaría un rol importante en la etiología del cáncer del cuello uterino. Ello se basa en una fuerte asociación observada desde puntos de vista epidemiológico, citológico, histológico, inmunológico y de biología molecular (1). Se han demostrado más de 50 tipos -de PVH (2), de los cuales algunos como el 6 y el 11 se encuentran frecuentemente en condiloma acuminado genital y displasias tempranas, mientras que PVH 16 y 18 se detectan en la mayoría de las displasias avanzadas y cáncer invasor (3).

Las técnicas de hibridación molecular son muy sensibles para la detección del ácido nucleico del PVH, existiendo dos fundamentales: hibridization Southern blot e hibridization *in situ* (4). En ambas se utilizan sondas de ácido desoxiribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) marcado con un radioisótopo (5), que formarán una molécula híbrida con el genoma (ADN) viral cuando este esté presente en el tejido neoplásico. Esta molécula marcada se hará visible con un proceso de autoradiografía en el cual se observa la positividad (señal de hibridización) como bandas oscuras en el caso del Southern blot, 6 gránulos oscuros (plata de la emulsión fotográfica) en la hibridización *in situ*. La intensidad de esta señal varía de acuerdo al número de copias del genoma viral presentes en cada célula (6). La técnica *in situ* se aplica en secciones de tejido fijado en formol y embebido en parafina, y permite estudiar la localización celular del ADN, evaluando además su distribución tisular y la morfología (5). Tiene la desventaja de ser menos sensible que Southern blot, requiriendo un mayor número de copias del genoma viral por célula.

No existen reportes previos acerca de la presencia del ADN del PVH en cáncer cervical recurrente luego de radioterapia. La radiación ionizante produce injuria subletal y muerte celular a través de daño al ADN nuclear, incluyendo ruptura de uniones entre nucleótidos, aberraciones cromosomiales y mutaciones. No se conoce si la radioterapia altera la hibridación molecular del ADN y ARN del PVH en las células del cáncer cervical.

Este estudio utiliza hibridación *in situ* para identificar y tipificar el PVH en cáncer primario y en lesiones recurrentes luego de radioterapia en la misma paciente. Se comparó cáncer primario y recurrente respecto al tipo de PVH, patrón de la señal de hibridación e intensidad de la misma, para así examinar el efecto de la terapia con radiaciones sobre el PVH en cáncer de cuello uterino.



MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL CLÍNICO

En este estudio se utilizó tejido fijado en formol y embebido en parafina, proveniente de biopsias de 10 pacientes con carcinoma de cuello uterino que presentaron recurrencia pelviana luego de ser tratadas con radioterapia en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), Lima, Perú (Tabla N.º 1). La edad de las pacientes fluctuó entre 34 y 65 años con una mediana de 52,5 años. El tiempo de recurrencia luego de completar radioterapia varió entre 6 y 29 meses, con una mediana de 15,5 meses. Ocho pacientes tuvieron carcinoma epidermoide y dos presentaron carcinoma adenoescamoso. Dos cánceres fueron bien diferenciados, cuatro medianamente diferenciados y los cuatro restantes pobremente diferenciados. La distribución por estadios clínicos fue la siguiente: Ib en un caso, IIb en cinco y IIIb en los cuatro restantes. Todos ellos recibieron radioterapia externa seguida de braquiterapia con radium, totalizando una dosis al punto A de 8,200 a 8,600 cGy.

Casos N°	Edad	Estadio	Tiempo de recurrencia (meses)	patología
1.	34	IIB	15	G3 ades.
2.	37	IIB	6	G3 ep.
3.	52	IIIB	20	G2 ep.
4.	44	IIIB	14	G3 ep.
5.	58	IIIB	28	G1 ep.
6.	65	IIIB	16	G3 ades.
7.	58	IB	29	G2 ep.
8.	57	IIB	13	G1 ep
9.	53	IIB	19	G2 ep
10.	42	IIB	12	G2 ep

Se contó con biopsias del tumor primario antes de la irradiación en 9 casos. Todas las lesiones recurrentes se localizaron dentro del campo de irradiación. Para ser catalogadas como recurrencias debieron presentar un periodo libre de enfermedad de por lo menos un año después de la radioterapia, a excepción de un caso en que la reaparición de la enfermedad ocurrió a los 6 meses. Los cortes histológicos fueron revisados inicialmente por un patólogo del INEN (GR), y luego confirmados por un coautor en Georgetown University (BJ) antes de la hibridización *in situ*. La historia clínica brindó información relativa a la fecha de diagnóstico, tratamiento, respuesta a la radioterapia y fecha de la recurrencia.

HIBRIDIZACIÓN IN SITU

Cada bloque de tejido fue procesado para hibridización en dos experimentos separados. En otros reportes se han descrito en detalle varias técnicas de hibridización *in situ* con tejidos embebidos en parafina (7,8). En este estudio se utilizaron sondas de ARN (ribosondas) marcado con S35 para investigar los tipos de PVH 6, 11, 16 y 18. Básicamente la técnica consistió en montar una sección de tejido de 4 m m en una lámina portaobjetos, desparafinarla, agregarle la sonda de ARN marcado, desnaturalizar el ácido nucleico del tejido y permitir la hibridización. Proceder luego a la autoradiografía utilizando emulsión Kodak NB-2, desarrollo, fijado, tinción con hematoxilina, eosina y colocación de lámina cubreobjetos. El examen al microscopio de luz permitió catalogar como positivo el caso cuando satisfizo los siguientes criterios: aumento a los gránulos de plata nucleares en por lo menos tres veces respecto a los controles negativos, más de una célula con hibridización positiva por cada campo de 400 aumentos, y ausencia de señal de hibridización con las otras tres sondas de PVH en secciones tisulares adyacentes. Se utilizaron como controles positivos injertos cutáneos humanos infectados con PVH 11, cultivados bajo la cápsula renal de ratones atímicos (9), y biopsias de cáncer de cérvix con presencia de PVH 16 y 18 demostrada por la técnica de Southern blot.



TABLA 2
RESULTADOS DE HIBRIZACION SIN SITU EN PACIENTES CON CANCER
CERVICAL RECURRENTE POSTRADIOTERAPIA

Casos N°	Cáncer primario	Cáncer recurrente	Patrón de hidridización
1.	-	-	Ninguno
2.	PVH 16	PVH 16	Focal
3.	PVH 16	PVH 16	Focal
4.	-	-	Ninguno
5.	PVH 16	PVH 16	Uniforme
6.	PVH 16	PVH 16	Uniforme
7.	-	-	Ninguno
8.	-	-	Ninguno
9.	PVH 16	-	Focal
10.	n . d.	PVH 16	Uniforme

Abreviaciones: n. d. no disponible

RESULTADOS

El PVH 16 fue el único tipo detectado y estuvo presente en 6 de los 10 casos (60%). Este PVH 16 fue identificado en el tumor primario y recurrente en 4 pacientes, y en un caso solamente en el tumor primario. En el caso número 10 se detectó PVH 16 en el tumor recurrente pero no se contó con tejido biopsico del tumor antes de la irradiación.

Se compararon las densidades de la señal de hibridización en las lesiones primarias y recurrentes en cada paciente. Aunque hubo diferencias evidentes entre pacientes distintos, no se apreció diferencia significativa en la señal cuando se trataba del mismo paciente. Se observaron dos patrones en la señal de hibridización que fueron llamados "uniforme" y "focal". En tres casos se encontró el primer patrón representado por una distribución uniforme de los gránulos de plata tanto en el núcleo como en el citoplasma de aproximadamente el 75% de las células malignas, con una intensidad 5 a 10 veces mayor que la señal de base. En otros tres casos se encontró una distribución focal con relativamente pocas células malignas mostrando gránulos de plata muy densos (más de 20 veces la intensidad de base), concentrados preferentemente en los núcleos de las mismas.

COMENTARIO

La tasa de detección del PVH por la técnica de hibridización *in situ* utilizando ribosondas es comparable con otras reportadas recientemente. Con la técnica de hibridización *in situ* ADN-ARN se encuentra el PVH en 30 a 80% de casos (6,8). Schneider y col. demostraron PVH 16 en el 60% de 17 cánceres invasores del cérvix utilizando sondas ARN, y estimó que la técnica era sensible a la presencia de 20-50 copias del genoma viral por célula (10). No se observó hibridización cruzada entre las cuatro sondas de PVH usadas.

En este estudio se reconocieron dos patrones diferentes de la señal de hibridización como se describió en otro reporte previo (10). Los cánceres con patrón "focal" tienen una señal muy intensa distribuida en relativamente pocas células malignas, ocurriendo lo contrario con el patrón "uniforme". El verdadero significado de esas diferencias de distribución e intensidad de la señal de hibridización es incierto, pero podría reflejar el potencial biológico del tumor Schneider describió una distribución uniforme e NIC III y en 15 de 17 cánceres invasores, mientras que la densidad "focal" fue característica en NICII y en algunos carcinomas medianamente diferencia dos (10).

Con la técnica utilizada en este estudio es posible detectar el ADN viral y el ARN de transcripción es así que demuestra la persistencia del ADN y ARN del PVH en el cáncer cervical recurrente luego de tratamiento con dosis terapéuticas de radioterapia. Las lesiones primarias y recurrentes mostraron una intensidad similar de la señal de hibridización sugiriendo que no hubo una alteración significativa en el número de copias del genoma viral, ni



en el nivel de transcripción, luego de radioterapia. Las sondas marcadas con S35 requieren 50 a 500 genomas virales por célula para producir una señal que se considere positiva con la hibridización *in situ* (10,11).

El RNA de transcripción ha sido detectado en cáncer cervical y en líneas celulares derivadas del mismo (12,13), así como en adenocarcinoma *in situ* (14), por ello, la señal intensa, especialmente en los tumores con distribución focal, probablemente representa RNAs de transcripción acumulados. Esta distribución focal de la señal sería indicativa de heterogeneidad en aspectos sutiles de la diferenciación de las células malignas, la cual no cambió con la radioterapia.

En el caso 10 hubo positividad en el tumor primario más no en el recurrente. Esto podría deberse a una pérdida del genoma viral o a un error geográfico de muestreo, puesto que en el tumor primario, una pocas células en un área limitada, mostraron positividad.

Estos experimentos de hibridización *in situ* en un pequeño número de casos de cáncer cervical son los primeros en demostrar la persistencia del ADN de PVH en cáncer recurrente Postradioterapia. Si tomamos la intensidad de la señal de hibridización como una medida grosera del ADN y ARN total celular entonces, estos experimentos indican que la radioterapia no altera el contenido de ADN y ARN del PVH en el cáncer cervical recurrente. La persistencia y la transcripción del ácido nucleico viral en cáncer recurrente añaden soporte a la teoría actual acerca del activo rol que jugaría el PVH en el mantenimiento del estado maligno.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zur, Hausen. Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res.* 49: 4677-4681, 1989.
2. Pfister, H. Current Papillomavirus Classification Scheme. Sixth International Papillomavirus Workshop, short review of current literature: 1-7, 1987.
3. Syrjänen K., Gissmann L., Koss L. Papillomaviruses and human diseases. Springer-velag, 1987.
4. Hames B.D., Higgins S.J. Nucleic acid hybridization: a practical approach. IRL Press, Oxford, UK, 1985.
5. Villa L.L. "In Situ" hybridization. XIV UICC Training Course in Cancer Research: 29, 1990.
6. Caussey, D. Evaluation of methods for detecting HPV DNA sequences in clinical specimens. *J. Clinical Microbiol.* 26(2):236-43, 1988.
7. Nagai N., et al. Detection of papillomavirus nucleic acid in genital precancers with the *in situ* hybridization technique. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 6: 366-79, 1987.
8. Stoler M.H., Broker T.R. *In situ* hybridization detection of human papillomavirus DNAs and messenger RNAs in genital condylomas and a cervical carcinoma. *Hum. Pathol.* 17: 1250-8, 1986.
9. Kreiner J.W., et al. *In vivo* transformation of human skin with human papillomavirus II from condylomata acuminata. *J. Virology*; 59 (2): 369-76, 1986.
10. Schneider A., et al. Distribution pattern of HPV 16 genome in cervical neoplasia by molecular *in situ* hybridization of tissue sections. *Int. J. Cancer* 39: 717-21, 1987.
11. Ostron R.S., et al. detection of HPV DNA in invasive carcinomas of the cervix by *in situ* hybridization. *Cancer Res.*; 47: 649-53, 1987.
12. Schneider A., Schwarz, E. Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of HPV type 18 early genes. *EMBO J.*; 5: 2285-92, 1986.
13. Pater M.M., Pater A. Expression of human papillomavirus types 16 and 18 DNA sequences in cervical cancer cell lines. *J. M. Virol.*; 26 (2): 185-95, 1988.



14. Farnsworth A., Lowerty C., Stoler M.H. Human papillomavirus messenger RNA expression in adenocarcinoma in situ of the uterine cervix. *Int. J. Gynecol. Path.*; 8 (4): 321-30, 1989.