



## Detección molecular del virus del papiloma humano en mujeres con condilomas cervicales tratadas con ácido tricloroacético

Elva I. Cortés Gutiérrez,\* Joel N. Witvrun Ávila,\* Glafir Sánchez Rodríguez,\* José A. Gaspar Belmonte,\* Fernando Hernández Garza,\*\* Ricardo M. Cerda Flores\*,\*\*\*

### RESUMEN

**Objetivos:** 1) determinar, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la existencia del virus del papiloma humano (VPH) en mujeres con condilomas cervicales después de aplicarles ácido tricloroacético y 2) evaluar la validez de la colposcopia *versus* la PCR (estándar de oro).

**Pacientes y métodos:** se incluyó una muestra seleccionada de 28 mujeres de 18 a 45 años de edad, con condilomas cervicales, sin datos de lesión neoplásica cervical y con diagnóstico de VPH positivo por PCR, se utilizaron los iniciadores MY09 y MY11. El gen de la  $\beta$ -globina se utilizó como control interno e indicador de la integridad del DNA. Las mujeres incluidas en este estudio se agruparon de forma pseudoaleatoria y ciega en: grupo tratado ( $n = 14$ ) y grupo placebo ( $n = 14$ ). Al grupo tratado se le aplicó una sola vez ácido tricloroacético al 90% en el área del cuello uterino, los fondos de saco y la vagina. Al grupo placebo se le aplicó suero fisiológico. El seguimiento consistió en el diagnóstico de VPH por colposcopia y por PCR a la octava semana de haberle aplicado el tratamiento a cada grupo.

**Resultados:** todas las mujeres amplificaron para el gen de la  $\beta$ -globina. En el grupo tratado con ácido tricloroacético, 11/14 (78%) no mostraron amplificación de VPH. Asimismo, la prueba colposcópica, en comparación con la PCR, reveló sensibilidad del 33.33% y especificidad del 54.54%.

**Conclusiones:** desde el punto de vista molecular, este estudio muestra que la aplicación de ácido tricloroacético causa destrucción física del tejido infectado, sin detectar daño del DNA, quizá por el proceso de descamación celular. La baja sensibilidad y especificidad de la colposcopia respecto a la PCR demuestra que la primera no es adecuada para el diagnóstico y seguimiento de la infección por VPH.

**Palabras clave:** ácido tricloroacético, virus del papiloma humano (VPH), neoplasia intraepitelial cervical.

### ABSTRACT

**Objectives:** 1) To determinate the presence of human papillomavirus (HPV) in women with cervical condylomas after the trichloroacetic acid application by the polymerase chain reaction (PCR) test, and 2) to validate the colposcopy test versus the PCR (gold standard).

**Patients and methods:** A selected sample of 28 women of 18 to 45 years old with cervical condyloma acuminata, without evidence of cervical neoplastic lesion and with positive diagnosis of HPV with PCR was included.  $\beta$ -globin gene was used as internal control and as DNA integrity marker. Women included in this study were divided in: treated group ( $n = 14$ ), which were treated just one time with trichloroacetic acid to 90% in the cervix, the cul de sacs and the vagina areas, and placebo group ( $n = 14$ ), which were treated with physiological saline. After eight weeks of being applied the treatment, each one of the 28 women was HPV diagnosed again by colposcopy and PCR.

**Results:** All women amplified for the  $\beta$ -globin gene. In the treated group, 11/14 (78%) patients did not show amplification. The colposcopy showed two negative false, five positive false, one positive true and six negative true tests, revealing sensitivity of 33.33% and specificity of 54.54%.

**Conclusions:** From the molecular point of view, this study showed that the trichloroacetic acid application causes physical destruction of the infected tissue, without detecting DNA damage due to the cellular desquamation. On the other hand, the colposcopy regarding the PCR is not an appropriate test for the diagnosis and follow-up of the HPV infection.

**Key words:** trichloroacetic acid, human papillomavirus (HPV), cervical intraepithelial neoplasia.

### RÉSUMÉ

**Objectifs:** 1) déterminer, moyennant la réaction en chaîne de la polymérase (PCR), la présence du virus du papillome humain (VPH) chez des femmes avec condylomes cervicaux après l'application de l'acide trichloroacétique et 2) évaluer la validité de la colposcopie *versus* la PCR (standard d'or).

**Matériel et méthodes :** on a inclus un échantillon sélectionné de 28 femmes âgées de 18 à 45 ans, avec condylomes cervicaux, sans données de lésion néoplasique cervicale et avec un diagnostic du VPH positif par PCR, utilisant les initiateurs de l'intégrité du DNA. Les

femmes incluses dans cette étude ont été groupées de façon pseudo aléatoire et aveugle en : groupe traité (n=14) et groupe placebo (n=14). Au groupe traité on a appliqué une seule fois acide trichloracétique au 90% sur la zone cervicale, le cul-de-sac et le vagin. Au groupe placebo on a appliqué du sérum physiologique. Le suivi a consisté dans le diagnostic du VPH par colposcopie et par PCR à la huitième semaine d'avoir appliqué le traitement à chaque groupe.

**Résultats :** toutes les femmes ont amplifié pour le gène de la  $\beta$ -globine. Dans le groupe traité avec acide trichloracétique, 11/ 14 (78%) n'ont pas démontré amplification du VPH. De même, le test colposcopique en comparaison avec la PCR a révélé sensibilité du 33.33% et spécificité du 54.54%.

**Conclusions :** du point de vue moléculaire, cette étude montre que l'application de l'acide trichloracétique cause destruction physique du tissu infecté, sans détecter dommage du DNA, peut-être du fait du processus de desquamation cellulaire. D'autre côté, la basse sensibilité et spécificité de la colposcopie par rapport à la PCR montre que la première n'est pas adéquate pour le diagnostic et suivi de l'infection du VPH.

**Mots-clé :** acide trichloracétique, virus du papillome humain (VPH), néoplasie intra épithéliale cervicale.

## RESUMO

**Objetivos:** 1) determinar, mediante a reação em cadeia da polimerase (PCR), a presença do vírus do papiloma humano (VPH) em mulheres com condilomas cervicais depois de aplicar-lhes ácido tricloroacético e 2) avaliar a validade da coloscopia *versus* a PCR (*standard* de ouro).

**Material e métodos:** Incluiu-se uma mostra selecionada de 28 mulheres de 18 até 45 anos de idade, com condilomas cervicais, sem dados de lesão neoplásica cervical e com diagnóstico de VPH positivo por PCR, usando os iniciadores MY09 e MY11. Utilizou-se o gene da  $\beta$ -globina como control interno e indicador da integridade do DNA. As mulheres incluídas neste estudo foram agrupadas de forma pseudoaleatória e cega em: grupo tratado (n = 14) e grupo placebo (n = 14) ao grupo tratado aplicousei-lhe ácido tricloroacético ao 90% uma vez só na área da cérvice, os fundos de saco e a vagina. O grupo placebo recebeu soro fisiológico. O seguimento consistiu no diagnóstico de VPH por coloscopia e por PCR à oitava semana de termos aplicado o tratamento a cada grupo.

**Resultados:** todas as mulheres amplificaram para o gene da  $\beta$ -globina. No grupo tratado com ácido tricloroacético 11/14 (78%) não mostrou amplificação de VPH. Igualmente, o teste coloscópico em comparação com a PCR revelou sensibilidade do 33.33% e especificidade do 54.54%.

**Conclusões:** desde a perspectiva molecular, o estudo mostra que a aplicação de ácido tricloroacético destrói fisicamente o tecido infestado, sem perceber dano do ADN, talvez devido ao processo de descarnação celular. Outro ponto é a baixa sensibilidade e especificidade da coloscopia ao respeito da PCR mostra que a primeira não é um teste adequado para o diagnóstico e seguimento da infecção de VPH.

**Palavras chave:** ácido tricloroacético, vírus do papiloma humano (VPH), neoplasia intraepitelial cervical.

**L**a infección por el virus del papiloma humano (VPH) es frecuente en la especie humana. Existe una gran variedad de enfermedades asociadas con éste, desde la muy común pero benigna verruga

vulgaris causada por VPH de bajo riesgo (VPH-BR), hasta el cáncer cervical causado por VPH de alto riesgo (VPH-AR).<sup>1</sup>

En la actualidad, el tratamiento subclínico del virus del papiloma humano causa bastante controversia. Si se considera su elevada recurrencia de regresión espontánea y la falta de fármacos antivirales específicos, muchos autores sugieren seguir un esquema conservador y tratar sólo las lesiones neoplásicas intraepiteliales cervicales.<sup>2</sup> Sin embargo, otros autores sugieren el tratamiento de todas las formas de infección del virus para prevenir la manifestación del cáncer cervical.<sup>3</sup>

Los tratamientos utilizados incluyen: crioterapia, terapia láser, el uso de 5-fluorouracilo, ácido tricloroacético y métodos quirúrgicos, como la conización cervical o la histerectomía total. Se desconocen los mecanismos de acción de estos

\* División de Genética, Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste (CIBIN) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Monterrey, Nuevo León.

\*\* Clínica de Displasias. Hospital Regional de Especialidades Núm. 23 Dr. Ignacio Morones Prieto, IMSS, Monterrey, Nuevo León.

\*\*\* Facultad de Enfermería. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León.

Correspondencia: Dra. Elva I. Cortés Gutiérrez. Centro de Investigación Biomédica del Noreste. Administración de Correos Núm.4 Apartado Postal 020, Col. Independencia, Monterrey, NL. México. 64720. Tel./fax: (01-81) 8190-4035.

E-mail: elvairenegocortes@hotmail.com

Recibido: agosto, 2004. Aceptado: diciembre, 2004.

La versión completa de este artículo también está disponible en internet: [www.revistasmedicasmexicanas.com.mx](http://www.revistasmedicasmexicanas.com.mx)

tratamientos, pero se cree que causan destrucción física del tejido infectado.

Todos los tratamientos han demostrado diferentes porcentajes de efectividad<sup>3</sup> y elevada recurrencia, debido a la presencia del virus del papiloma humano en el epitelio clínicamente normal y al grado variable de daño al DNA-VPH asociado con cada tratamiento.<sup>4</sup>

La reacción en cadena de la polimerasa permite la amplificación e identificación de secuencias específicas de DNA existentes en especímenes clínicos.

El daño al DNA causado por agentes físicos, químicos o biológicos no permite la amplificación de dichas secuencias.

Para obtener mayor información del mecanismo de acción del ácido tricloroacético se plantearon los siguientes objetivos: 1) determinar, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, la presencia del virus del papiloma humano en mujeres con condilomas cervicales después de aplicarles ácido tricloroacético y 2) evaluar la validez de la prueba colposcópica *versus* la PCR (estándar de oro).

## PACIENTES Y MÉTODOS

### Población estudiada

Se realizó un estudio prospectivo de enero a noviembre del 2003 en 75 mujeres remitidas a la clínica de displasias del Hospital Regional de Especialidades Núm. 23 Ignacio Morones Prieto del IMSS. A todas se les realizó diagnóstico colposcópico<sup>5</sup> y PCR para infección del virus del papiloma humano.

Se seleccionaron 28 mujeres de 18 a 45 años de edad, con condilomas cervicales, sin antecedentes de neoplasia intraepitelial cervical y con diagnóstico positivo para VPH por PCR. Se les dividió de forma pseudoaleatoria y ciega (MINITAB v 12.0) en dos grupos: grupo tratado, formado por 14 pacientes a las cuales se les aplicó una sola vez ácido tricloroacético al 90%, mediante embrocación de todo el cuello uterino, hasta que adquiría coloración blanquecina; y grupo placebo, formado por 14 mujeres a las que se les aplicó suero fisiológico al 0.9% utilizando el mismo procedimiento.

El seguimiento se llevó a cabo mediante revisión colposcópica y PCR después de ocho semanas de tratamiento.

A todas las mujeres incluidas en el estudio se les aplicó una encuesta acerca de sus antecedentes ginecobstétricos. Además, se les sugirió el uso del condón al mantener relaciones sexuales durante las ocho semanas de seguimiento para evitar reinfección por la pareja sexual no tratada.

Este estudio lo aprobó el comité de ética y bioseguridad del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS.

### Detección y tipificación molecular del VPH

El DNA de las muestras cervicovaginales se extrajo mediante la técnica de extracción fenólica. La amplificación génica del virus del papiloma humano se realizó con la técnica de PCR, utilizando los iniciadores MY09 y MY11, que corresponden a la región L1, que es altamente conservada entre los diferentes tipos de VPH. Además, se utilizó como control interno e indicador de integridad de DNA el gen de la  $\beta$ -globina (PO4 y G20). Los productos de la amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio.

Se consideró como VPH positivo (+) a las mujeres en quienes se identificó la banda correspondiente al VPH (450 pb) y el gen de la  $\beta$ -globina (260 pb), y como VPH negativo (-) a las que no tuvieron amplificación para el VPH, pero sí para el gen constitutivo ( $\beta$ -globina).<sup>6</sup>

Se utilizaron controles apropiados de amplificación, cultivos celulares infectados con VPH (Hela), como control positivo, y muestras sin DNA templado, como control negativo.

Los productos amplificados se tipificaron mediante el análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción, al usar las enzimas de restricción Hae III, Pst I y Rsa I.<sup>6</sup> La clasificación de los tipos de VPH se realizó de acuerdo con el nivel de riesgo de manifestar carcinoma cervical y fue de: bajo riesgo (VPH-6 y VPH-11) y alto riesgo (VPH-16, 18, 31 y 33).<sup>6</sup>

### Análisis estadístico

Se realizó una tabla de contingencia de 2x2 para evaluar la sensibilidad, la especificidad y los valores de predicción positivo (VPP) y negativo (VPN) de la colposcopia, considerando la PCR como estándar de oro.

## RESULTADOS

Los antecedentes ginecobstétricos de los grupos tratado y placebo se muestran en el cuadro 1. La mayoría de las mujeres eran multigestas, con inicio de actividad sexual entre los 15 y 25 años, con una pareja sexual, utilizaban dispositivo intrauterino y no tenían antecedentes de abortos ni de tabaquismo. Las características fueron similares en ambos grupos.

**Cuadro 1.** Características ginecobstétricas de las 28 mujeres estudiadas

	Placebo (n = 14)	Tratado (n = 14)
<b>Edad</b>		
18 a 30	2	1
31 a 40	10	12
41 a 50	2	1
<b>Embarazos</b>		
Nuligestas	1	3
Primigestas	3	5
Multigestas	10	6
<b>IAS</b>		
15 a 20	12	11
21 a 25	1	2
26 o más	1	1
<b>Núm. de parejas sexuales</b>		
1	10	12
2	3	1
3 o más	1	1
<b>Tabaquismo</b>		
Sí	4	3
No	10	11
<b>Anticonceptivos</b>		
No	2	3
Orales	4	2
DIU	8	9
<b>Abortos</b>		
Sí	3	1
No	11	13

IAS: inicio de actividad sexual.

En el cuadro 2 se muestra la detección molecular del VPH en las pacientes con condilomas cervicales tratadas con ácido tricloroacético al 90% y con placebo. Todas las mujeres amplificaron para el gen de la  $\beta$ -globina. En el grupo tratado con ácido tricloroacético,

después de ocho semanas, 11/14 (78%) mujeres no amplificaron para el virus del papiloma humano, mientras que en el grupo placebo la cifra fue 2/14 (14.28%) mujeres.

**Cuadro 2.** Detección molecular del VPH en pacientes con condilomas cervicales tratadas con ácido tricloroacético al 90% y con placebo

	n	BG (-)	BG (+)	VPH (-)	VPH (+)
Tratado*	14	0	14	11	3
Placebo**	14	0	14	2	12

BG: gen de la  $\beta$ -globina.

\* Mujeres tratadas con ácido tricloroacético al 90%.

\*\* Mujeres tratadas con placebo (suero fisiológico al 0.90%).

El análisis de genotipificación del VPH, antes del tratamiento con el ácido tricloroacético, demostró 11 mujeres con VPH-BR y 3 con VPH-AR. Las mujeres tratadas con placebo mostraron valores similares, de 12 y 2, respectivamente. Después del tratamiento, 11 mujeres resultaron VPH (-), 2 tuvieron VPH-BR y 1 VPH-AR (cuadro 3). Dos mujeres del grupo placebo resultaron VPH (-), 10 con VPH-BR y 2 con VPH-AR.

El análisis de validación de la prueba colposcópica *versus* la PCR después del tratamiento demostró dos pacientes falsas negativas, cinco falsas positivas, una verdadera positiva y seis verdaderas negativas, lo cual reveló sensibilidad del 33.33%, especificidad del 54.54%, valor de predicción positivo de 16.66% y valor de predicción negativo de 75.00% (cuadro 4).

Todas las mujeres tratadas con ácido tricloroacético reportaron descamación leve de la mucosa vaginal, sin datos de vaginitis, y dos mujeres del grupo placebo tuvieron secreciones vaginales.

## COMENTARIOS

Desde el punto de vista molecular, este estudio muestra que la aplicación de ácido tricloroacético causa destrucción física del tejido infectado, sin detectarse daño al DNA, quizá por el proceso de descamación celular que se manifestó en todas las mujeres tratadas, ya que Zhu y colaboradores<sup>7</sup> reportan daño al DNA *in vitro* en 93% de las biopsias tratadas con ácido tricloroacético. Dado los resultados se considera importante realizar un estudio posterior

**Cuadro 3.** Genotipificación del VPH antes y después del tratamiento con ácido tricloroacético al 90%

	<i>n</i>	VPH(-)	Tratamiento con ATA al 90%			Después	
			Antes VPH-BR	VPH-AR	VPH (-)	VPH-BR	VPH-AR
Tratado*	14	0	11	3	11	2	1
Placebo**	14	0	12	2	2	10	2

\* Mujeres tratadas con ácido tricloroacético al 90%.

\*\* Mujeres tratadas con placebo (suero fisiológico al 0.90%).

BR: bajo riesgo (infección única de VPH-6 o VPH-11); AR: alto riesgo (infección única de VPH-16, 18, 31 ó 33).

para determinar la presencia del VPH y el daño al DNA antes del proceso de descamación celular, es decir, inmediatamente después de aplicar el ácido tricloroacético.

**Cuadro 4.** Tabla de contingencia de 2x2 para validar la colposcopia versus la PCR para el diagnóstico del VPH después del tratamiento con ácido tricloroacético

	PCR		
	(+)	(-)	Total
Colposcopia (+)	1	5	6
Colposcopia (-)	2	6	8

Sensibilidad = 33.33%; especificidad = 54.54%; valor de predicción positivo = 16.66%; valor de predicción negativo = 75.00%.

Los resultados de este estudio señalan que la aplicación de ácido tricloroacético causó destrucción física total del tejido infectado en 78% de las mujeres tratadas y destrucción parcial en 22% de ellas.

Los VPH-BR son más susceptibles al tratamiento que los VPH-AR, lo cual concuerda con estudios previos.<sup>8</sup> La reversión espontánea de la infección del VPH observada en este estudio (14%) también coincide con lo reportado anteriormente por Boothby y su equipo (16%).<sup>9</sup>

Asimismo, estos resultados demuestran baja sensibilidad y especificidad de la colposcopia, hallazgos que concuerdan con reportes previos realizados por Lie<sup>10</sup> y Gjoen,<sup>11</sup> donde informan que los métodos morfológicos son inespecíficos para la detección del VPH.

Las discrepancias que se aprecian en los valores de eficacia del tratamiento con ácido tricloroacético, evaluada por colposcopia en reportes previos,<sup>12,13</sup> y la baja sensibilidad y especificidad observada en este estudio demuestran que este método no es adecuado

para diagnosticar el VPH, y sugieren la necesidad de establecer nuevas metodologías moleculares, altamente sensibles, útiles en el diagnóstico y seguimiento de la infección con el virus en centros hospitalarios.

En conclusión, este estudio contribuye a conocer el mecanismo de acción del ácido tricloroacético; sin embargo, los resultados deberán ser validados por otros autores mediante diseños de metaanálisis.

## REFERENCIAS

- Muñoz N, Bosch F. Cervical cancer and human papillomavirus: epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud Publica Mex* 1997;39:274-82.
- Lee SS, Collins RJ, Pun TC, Cheng DK, Ngan HY. Conservative treatment of low grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) of the cervix. *Int J Gynaecol Obstet* 1998;60:35-40.
- Russomano F, Reis A, de Camargo MJ, Peixoto-Dutra MV, Costa-Fonseca S, Anderson J. Efficacy in treatment of subclinical cervical HPV infection without intraepithelial neoplasia: systematic review. *Sao Paulo Med J/Rev Paul Med* 2000;118:109-15.
- Gross G. Clinical aspects and therapy of anogenital warts and papillomatosis-associated lesions. *Hautarzt* 2001;52:6-17.
- Walker P, Dexeus S, de Palo G, Barrasso R, Campion M, Girardi F, et al. International terminology of colposcopy: an updated report from the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. *Obstet Gynecol* 2003;101:175-7.
- Bauer H, Greer C, Manos M. Detection of human papillomavirus infection using PCR. In: Herrington CS, McGee JO, editors. *Diagnostic molecular pathology: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press, 1992;pp:131-52.
- Zhu WY. Detection with the polymerase chain reaction of human papillomavirus DNA in condylomata acuminata treated *in vitro* with liquid nitrogen, trichloroacetic acid, and podophyllin. *J Am Acad Dermatol* 1993;26:710-4.
- Gal D. Transmissibility and treatment failures of different types of human papillomavirus. *Obstet Gynecol* 1989;73:308-10.
- Boothby RA, Carlson JA, Rubin M. Single application treatment of human papillomavirus infection of the cervix and vagina with trichloroacetic acid. *Obstet Gynecol* 1990;76:278-80.
- Lie AK, Skjeldestad FE, Hagen B, Johannessen E, Skarsvag

- S, Haugen A. Comparison of light microscopy *in situ* hybridization and polymerase chain reaction for detection of human papillomavirus in histological tissue for cervical intraepithelial neoplasia. APMIS 1997;105:115-20.
11. Gjoen K, Satter T, Olsen AO, Orstavik I. Correlation between polymerase chain reaction and cervical cytology for detection of human papillomavirus in histological tissue of cervical intraepithelial neoplasia. APMIS 1997;105:71-75.
  12. Méndez-Velásquez JF, González-Sánchez JL, Rodríguez-de Santiago JD. Tratamiento de la infección cervical por el virus del papiloma humano con ácido tricloroacético. Ginecol Obstet Mex 1993;61:48-51.
  13. Malviya VK, Deppe G, Pluszczynski R, Boike G. Trichloroacetic acid in the treatment of human papillomavirus infection of the cervix without associated dysplasia. Obstet Gynecol 1987;70:72-74.