

Bioquimia

Volumen 27
Volume

Número 4
Number

Diciembre 2002
December

Artículo:

Prevalencia de virus de papiloma humano
de alto riesgo en el epitelio anal de hombres
VIH positivos

Derechos reservados, Copyright © 2002:
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC

**Otras secciones de
este sitio:**

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

***Others sections in
this web site:***

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)



www.Medigraphic.com

Prevalencia de virus de papiloma humano de alto riesgo en el epitelio anal de hombres VIH positivos

Paula Villanueva¹, Paulina Díaz¹, Miriam Guido^{1,2}, Aaron Rangel⁴, Rita Sotelo³,
Alejandro García-Carrancá^{*1,2}

¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas - UNAM, México, D.F., ²División de Investigación, Instituto Nacional de Cancerología - SSA, México, D.F. ³Servicio de Citología, Instituto Nacional de Cancerología - SSA, México, D.F., ⁴Clínica Especializada Condesa, México, D.F.

*Sobretiros: Laboratorio de Virus y Cáncer, Unidad de Investigaciones Biomédicas en Cáncer, UNAM-INCan, Edificio "viejo" de Investigación, Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando # 22, 14000, México, D.F., e-mail: carranca@servidor.unam.mx
Recibido: 15/10/02 Aceptado: 28/10/02

Resumen

Existen cerca de 200 tipos distintos de Virus de Papiloma Humano (VPH), de los cuales alrededor de 70 están asociados con neoplasias anogenitales. De ellos, un sub-grupo se encuentra frecuentemente asociado a la formación de lesiones escamosas intraepiteliales y carcinomas, por ello, se ha denominado de "alto" riesgo. Varios reportes han demostrado que los hombres que tienen sexo con hombres (HSH) y que son positivos al VIH, presentan una mayor incidencia de lesiones precursoras y de cáncer anal que aquellos que no lo son.

En este trabajo se realizó un estudio con 31 pacientes hombres VIH positivos que tienen sexo con hombres, para determinar la prevalencia de infecciones con VPH. Se utilizó la prueba de captura de híbridos II, que permite la detección de 18 tipos virales distintos. Encontramos una alta prevalencia de VPH en el epitelio anal de estos pacientes, que alcanza casi el 75%. El 58% de los pacientes fue positivo para ambos tipos virales ("alto" y "bajo" riesgo) mediante esta prueba, lo cual indica que un alto porcentaje de estos pacientes presenta infección múltiple de VPH.

Este estudio enfatiza la necesidad de hacer la detección oportuna de infecciones de VPH en hombres que tienen sexo con hombres y son VIH positivos.

Palabras clave: virus de papiloma humano, SIDA, lesiones precursoras, cáncer, tracto anal.

Abstract

Almost 70 types of Human Papilloma virus (HPV) are associated with lesions of the anogenital tract. High-risk HPV types (such as HPV16, 18, 30, 31, and 33) are frequently found associated with anal squamous intraepithelial lesions. It has been shown that HIV-positive men who have sex with men are in higher risk of developing precancerous anal lesions. This increased risk is related to HPV infection and to the immunosuppression associated with HIV.

The present work is a cross-sectional study with 31 HIV-positive men who have sex with men (MSM) to determine the prevalence of HPV in the anal canal. HPV DNA was detected using the Hybrid Capture II assay. Anal infection of HPV was detected in 74.2% of the subjects. Infection with multiple types (positive to both assays: low and high-oncogenic risk types) was found in 58%.

This study emphasizes the need for HPV screening in HIV-positive MSM due to their high risk for HPV anal infection and HPV-associated anal disease.

Key words: HPV, HIV, anal cancer, AIDS.

Introducción

El cáncer anal es una neoplasia rara. Si bien en México su frecuencia no se conoce con exactitud, se estima que puede corresponder al 0.18% del total de las malignidades y al 1.5% de las neoplasias anorectales. En los Estados Unidos se reportan aproximadamente 1000 casos nuevos por año, predominantemente en mujeres entre los 60 y 80 años de edad. ¹ Anteriormente, se sabía que la relación mujer:hombre para esta malignidad era de 3:1. Sin embargo, en la última década se ha visto un cambio en la demografía del cáncer anal, la relación actual es de 1.5:1. El nuevo grupo de riesgo que se ha identificado, son los hombres que tienen sexo con hombres

(HSH). Hace 27 años el 8% de los pacientes hombres con cáncer anal eran HSH, mientras que actualmente esta proporción aumentó a un 72%. ²

En el Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, se reportó que antes de 1994 se atendían de 4 a 5 pacientes por año con esta neoplasia, pero que a partir de 1994 se registró un aumento en estos casos: en 1994 - 19 casos, 1995 - 22 casos y 1996 - 27 casos. Por otro lado, en esta población también se observó un incremento en sujetos hombres menores de 55 años, de los cuales el 96% eran HSH, y el 59% eran HSH VIH+. ¹

Existen varios reportes que han demostrado que los pacientes HSH y que son VIH positivos presentan una mayor incidencia de

lesiones precursoras de cáncer que aquellos que son VIH negativos.^{3, 4, 5} Se ha postulado que el incremento en el riesgo de desarrollar un cáncer puede deberse a la mayor frecuencia de infección por VPH en esta población. Esta infección se encuentra en mayor proporción en los HSH HIV+ (93%) y en una menor proporción, pero no menos importante en los VIH- (61%).^{6, 7}

La incidencia de cáncer anal entre HSH en EUA se ha estimado en 35 / 100,000, la cual es varias veces mayor que la tasa de cáncer cervicouterino en mujeres en este País (8 / 100,000 mujeres) y es similar a la tasa de éste antes de la introducción del diagnóstico por citología (Papanicolaou).⁸ El impacto de la epidemia de VIH en la incidencia del cáncer anal aún se desconoce, la estimación de 35 / 100,000 se realizó antes de que se presentara la epidemia de VIH. La prevención del cáncer cervicouterino a través de la detección oportuna por citología, depende de la identificación y tratamiento de las lesiones intraepiteliales escamosas antes de su progresión a cáncer. Por lo que, el cáncer anal pudiera ser prevenible de la misma manera.⁸

En 1999 en la Universidad de Harvard se realizó un estudio para evaluar la efectividad clínica y el costo-beneficio de la detección oportuna de lesiones anales por citología (Pap) en HSH VIH+. ⁹ Los resultados indicaron que si la prueba se realiza en una etapa temprana de la infección por VIH (cuentas de CD4 mayores de 500 células/ mL), la citología cada 2 años resulta lo más adecuado. Por otro lado, si se inicia en etapas avanzadas de la infección por VIH, una citología anual es preferible, pues el riesgo a desarrollar enfermedades anales se ve aumentado. Este tipo de detección temprana resulta de gran importancia para los pacientes VIH+, pues los tratamientos antiretrovirales incrementan la expectativa de vida, sin disminuir el riesgo de progresión a cáncer.

En los últimos años se han realizado estudios para detectar al VPH en muestras de carcinoma anales, y se ha encontrado un resultado positivo para la mayoría de estos casos, principalmente para el VPH tipo 16.¹⁰ Tanto el epitelio cervical como el anal pueden tener cambios, conocidos como lesiones intraepiteliales escamosas (SIL). La presencia de VPH tipo 16 en la región anal tiene un riesgo oncogénico similar al que se presenta en las lesiones cervicales, pues se encuentra en la mayoría de los casos en lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL). Por otro lado, las lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL), presentan tipos de VPH conocidos en el cervix como de bajo riesgo oncogénico como el PVH tipo 6 y 11.¹¹

En el cervix, las SIL de alto grado (HSIL) se sabe que son precursoras de cáncer invasor. Dadas las similitudes entre el cáncer cervical y el cáncer anal, es probable que una HSIL anal sea también precursora de cáncer. Por el contrario, las LSIL generalmente no

progresan a HSIL, y por lo tanto no conducen a cáncer. Hay que remarcar que esta situación se puede ver alterada en pacientes inmunocomprometidos. Aun no se conoce la frecuencia en la que una HSIL anal progresa a cáncer invasivo, y si el tratamiento de ésta puede prevenir el desarrollo del cáncer; sin embargo, tomando el cáncer cervicouterino como modelo, el cáncer anal se puede prevenir a través de pruebas dirigidas de diagnóstico oportuno (como el Papanicolaou).¹¹

El genoma del virus del papiloma humano (VPH), es de aproximadamente 8000 pares de bases, está formado por 6 genes tempranos (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y 2 genes tardíos que forman la cápside.^{12, 13}

Los genes E6 y E7 son oncogenes cuyos productos se unen a dos proteínas celulares que son vitales para el control de la división y la proliferación celular. La proteína E6 se une a p53 e induce su degradación. La integridad de p53 es fundamental para la respuesta de las células ante daño al ADN, pues induce un arresto en la división celular y permite la reparación de los daños al ADN. La proteína E7 por su parte, se une a una serie de proteínas celulares regulatorias, en especial al producto del gen retinoblastoma, pRb. La proteína pRb regula la proliferación celular y permite el proceso normal de diferenciación, el cual se ve afectado por su interacción con E7. La actividad reguladora de pRb depende de su capacidad para unirse y controlar negativamente la acción de factores de transcripción como E2F, que se encarga de controlar la expresión de otros genes importantes en el ciclo celular.^{12, 14}

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tiene un diámetro de 80 a 120 nm. Posee dos copias idénticas del genoma viral formado por una cadena sencilla de ARN. Una vez que el virus infecta su célula blanco (Linfocitos T CD4+), mediante receptores celulares (antígeno CD4) que son reconocidos por la envoltura del virus, se sintetizan cadenas complementarias de DNA mediante la acción de la transcriptasa reversa. La doble cadena de DNA formada, se integra en el genoma celular para llevar a cabo la transcripción de los factores virales necesarios para la replicación del virus y completar su ciclo.¹⁵

Existen diversos tipos de cáncer que se han asociado con las infecciones por VIH, principalmente el Sarcoma de Kaposi, el linfoma no-Hodgkin, el linfoma Hodgkin, el cáncer oral, de testículo, anogenital y de cerebro. El cáncer anogenital en los individuos VIH+, a diferencia de otros cánceres comunes en estos pacientes, se puede prevenir.

Es probable que la infección por VPH ocurra antes de la infección con VIH. La respuesta inmune al VPH no se conoce del todo, sin embargo una vez establecida la infección se sabe que la respuesta

inmune es mediada por células. Bajo el control de esta respuesta inmune, la infección por VPH puede ser erradicada o bien mantenida en un estado de latencia. Con la pérdida de la respuesta inmune debido a la infección por VIH, la inmunidad específica para el VPH se ve disminuida activando la replicación del VPH. Los elevados niveles de ADN viral, así como la expresión de sus proteínas, pueden llevar al desarrollo de una enfermedad anogenital clínicamente detectable.¹¹

Una consecuencia de suma importancia de la infección por el VPH, además de su asociación con el cáncer anal, es la posible participación como cofactor para la infección por VIH. Las lesiones intraepiteliales escamosas se encuentran muy vascularizadas, por lo que sangran fácilmente después de la relación sexual, facilitando la entrada del VIH. Los hombres y mujeres VIH- con SIL anal o cervical, tienen mayor riesgo de adquirir una infección por VIH, que aquellos que tienen la mucosa anogenital normal. De la misma manera, hombres y mujeres VIH+ con SIL, tienen riesgo de adquirir nuevas cepas de VIH.^{16, 17}

En Estados Unidos, se ha visto que la mayoría de los pacientes hombres que tienen sexo con hombres VIH+ presentan infección anal por VPH y por lo tanto la posibilidad de desarrollar una lesión anal intraepitelial escamosa (ASIL), principalmente los pacientes asintomáticos y con cuenta baja de linfocitos CD4.¹⁸ En un estudio realizado por Palefsky y colaboradores en 1988, se evaluaron hombres que tenían sexo con hombres tanto VIH+ como VIH-.⁷ Partiendo de una base donde todos los pacientes presentaban una citología normal, se observó a lo largo de 2 años que la probabilidad que tiene un paciente VIH+ para desarrollar ASIL (50%) es mayor a que lo haga un paciente VIH- (17%). Estos porcentajes se vieron aumentados si los pacientes presentaban originalmente algún tipo de anomalía citológica. En pacientes VIH+, el riesgo es aún mayor si la cuenta de CD4 es menor a 200 células/mL, que en aquellos con una cuenta mayor a 500 células/mL, al igual que en pacientes con un coeficiente CD4/CD8 menor de 1.^{4, 5}

Un mecanismo de interacción entre el VIH y el VPH, que no se ha demostrado *in vivo*, se refiere a la interacción entre las células infectadas por VIH que circulan en el tejido conjuntivo debajo de la membrana basal, y las células infectadas por VPH sobre éstas. Estas interacciones pueden estar mediadas por la expresión aberrante de citocinas, que se sabe modulan la expresión de genes del VPH, como la Interleucina 6 (I16) o la expresión aberrante de factores de crecimiento. Otro mecanismo de interacción entre los dos virus incluye los efectos de proteínas secretadas por el VIH-1 sobre las células infectadas por VPH. Hay evidencia que sugiere que la proteína Tat del VIH-1, puede potenciar la expresión de E6 y E7, a través de la posible interacción con la región reguladora de la transcripción (LCR) del VPH. Esto no ha sido demostrado *in vivo*.^{7, 19}

Por todo lo anterior, consideramos que es importante el diagnóstico temprano de VPH por técnicas moleculares. En nuestro país no existen datos sobre la prevalencia de este virus en la población HSH VIH+, por lo que intentamos abordarlo a través del estudio de esta población.

Métodos

Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra para el estudio se determinó con la fórmula para tamaño de muestra para estudios transversales. Se estimó la prevalencia de VPH en la población en estudio de acuerdo a varios estudios relacionados,^{8, 18, 20} de aproximadamente 90%. Se determinó con un coeficiente de confidencialidad de 1.96 y un error máximo de muestreo del 0.5%, una muestra de final de 31 pacientes.

Población

Treinta y un pacientes fueron reclutados para el estudio entre una población de hombres que tienen sexo con hombres que asisten a una clínica de VIH privada. Los pacientes participaron bajo su consentimiento. Se les realizó una entrevista en base a un cuestionario acerca de su historial médico relacionado con VIH, historia de ETS (Enfermedades de transmisión sexual), condiciones anales (fistulas, hemorroides, condilomas), prácticas sexuales y hábitos. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a la Ley General de Salud en material de Investigación en Salud.

Prueba citológica

Se utilizó la prueba de Papanicolaou para la detección de anomalías en el canal anal. Los resultados citológicos de las lesiones se expresaron de acuerdo con el sistema Bethesda,^{21, 22} como se muestra en el cuadro 1.

Para la toma de muestra del canal anal, se le pidió al paciente que no tuviera relaciones sexuales anales, ni se realizara enemas, en 24 horas previas.⁶ Se limpió el canal anal con un hisopo humedecido en agua, se insertó después el Citobrush en él y se giró lentamente mientras se sacaba para propiciar su contacto con la pared del canal anal. Inmediatamente se realizó el frotis en una laminilla y se fijó con Citospray de manera habitual. Posteriormente se realizó la tinción de Papanicolaou de manera habitual, para su estudio al microscopio. El cuadro 1 compara diferentes sistemas utilizados para clasificar anomalías de células escamosas.

Detección de ADN de VPH por captura de híbridos II

Para obtener las muestras, se repitió el procedimiento descrito anteriormente, colocando el citobrush con el espécimen en un tubo que contenía 1 mL de medio de transporte (Digene Diagnostics,

Cuadro 1. Clasificación de anomalías de células escamosas

Descripción	Sistema AIN	Sistema Bethesda	Clase (Clasificación anterior)
Normal	Normal	Normal	Clase I
Atípic	Atípic	ASCUS	Clase II
Atípic con VPH	Atípic Condilomatosa	SIL de bajo grado	Clase II
Displasia leve	AIN I	SIL de bajo grado	Clase III
Displasia moderada	AIN II	SIL de alto grado	Clase III
Displasia severa	AIN III	SIL de alto grado	Clase III
Carcinoma <i>in situ</i>	AIN III	SIL de alto grado	Clase IV
Cáncer Invasivo	Cáncer Invasivo	Cáncer Invasivo	Clase V

Actualmente existen dos esquemas para reportar los resultados de la prueba citológica, lo que resulta ser una fuente de confusión. El sistema anterior que reportaba el resultado clasificándolo en una de cinco clases, está siendo reemplazado por el sistema Bethesda. La clasificación para las lesiones cervicales se utiliza también para clasificar a las lesiones anales.

Silver Spring MD), congelándolas a - 20°C hasta ser procesados para su análisis. Para determinar la presencia de virus de papiloma humano, se utilizó la prueba de detección *Digene HPV Test Hybrid Capture II*, de acuerdo con lo descrito por el fabricante (Digene Diagnostics, Silver Spring MD). De manera breve, después de descongelar la muestra, se le agrega una solución alcalina y se pone durante 45 minutos a 65°C, lo que permite desnaturalizar el ADN que se hibridiza con sondas de ARN específicas para distintos tipos de VPH. Los híbridos ADN:ARN formados se capturan en la superficie de una microplaca cubierta con anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente estos híbridos, los cuales quedan inmovilizados en ella. Posteriormente, se hacen reaccionar estos híbridos capturados, con un segundo anticuerpo dirigido también contra ellos y conjugado con fosfatasa alcalina. Se produce finalmente una reacción luminiscente, la cual es medida como unidades relativas de luz (RLU) en un Luminómetro. La intensidad de la luz emitida, señala la presencia o ausencia de ADN del VPH en la muestra. Un RLU igual o mayor al valor de corte (establecido por los valores de los calibradores), indica la presencia de ADN de alguno de los tipos virales incluidos en la prueba, mientras que un valor menor indica la ausencia de ADN viral, o niveles inferiores a los detectados por el ensayo.

La prueba de captura de híbridos II está diseñada para detectar 1pg/mL de ADN de un conjunto de tipos de VPH de distinto riesgo oncogénico. La prueba "A" permite identificar 5 tipos de VPH de "bajo" riesgo (tipos 6, 11, 42, 43 y 44) y la prueba "B" permite identificar 13 tipos distintos de VPH de riesgo oncogénico "alto" e "intermedio" (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 69).

Métodos Estadísticos

Los datos se analizaron a través de tablas de frecuencia y porcentajes. Comparaciones de dos proporciones se realizaron a través de una prueba de χ^2 . Se consideraron asociaciones estadísticamente significativas al nivel del 95%, cuando $p < 0.05$

Resultados

Población de estudio

La población de estudio estuvo constituida por 31 pacientes hombres en edad productiva (Cuadro 2a), con un promedio de edad de 38.7 años. Todos ellos cuentan con un nivel académico mínimo de secundaria, aunque la mayoría presenta nivel profesional (32.3%), e incluso posgrado (25.8%). En la mayoría de la población, el diagnóstico de VIH se realizó en los últimos 5 años (16 de 31), mientras que en solo 5 de ellos el diagnóstico tiene más de 10 años. Todos los pacientes son hombres que tienen relaciones sexuales con otros hombres (HSH), la mayoría manifiesta tener pareja permanente (67%) y usar condón de manera rutinaria desde el diagnóstico de VIH.

En los cuadros 2a y 2b se muestran las características generales de la población estudiada (31 sujetos) y las de aquellos pacientes que resultaron positivos para algún tipo de VPH. Esta información se obtuvo durante la entrevista realizada antes de la toma de muestra y del historial clínico de cada paciente.

La mayoría de los pacientes presentan padecimientos anogenitales. La mitad de ellos sufre de hemorroides y el 42% presentó historia de alguna otra enfermedad de transmisión sexual (ETS), siendo gonorrea la principal.

En relación a su nivel de inmunodeficiencia, el 42% de los pacientes (31) presentaba menos de 200 células CD4+/mL. Con respecto a la carga viral, la distribución en estos pacientes era bimodal, pues mientras que el 30% presentaba niveles indetectables de virus (menos de 500 copias/mL), otro 30% presentaba niveles elevados, con más de 30 000 copias/mL. Cabe mencionar que si bien todos estos pacientes se encontraban bajo tratamiento con antiretrovirales, algunos presentan valores de células CD4 y carga viral de VIH extremos.

Cuadro 2a. Características de la población estudiada y de los pacientes VPH+

Características de la población	Población total N=31 N (%)	Población VPH+ N= 23 N (%)
Datos de la entrevista		
Edad promedio(años +/-DS)	38.7 +/- 8.6	36.9 +/- 7.7
Escolaridad		
Secundaria	1 (3.23)	1 (4.34)
Técnico	6 (19.35)	6 (26.08)
Preparatoria	6 (19.35)	5 (21.73)
Profesional	10 (32.26)	6 (26.08)
Posgrado	8 (25.81)	5 (21.73)
Cuenta de células CD4(células/mL)		
<200	13 (41.94)	11 (47.83)
200-500	5 (16.13)	5 (21.73)
>500	13 (41.94)	7 (30.43)
Carga viral (copias/mL)		
No detectable (<500)	10 (32.26)	7 (30.43)
500 - 5 000	6 (19.35)	5 (21.73)
5 000 - 30 000	4 (12.90)	2 (8.69)
>30 000	11 (35.48)	9 (39.13)
Rol en la relación sexual anal		
Activo	7 (22.58)	3 (13.04)
Receptor	2 (6.45)	2 (8.69)
Activo/Receptor	22 (70.97)	18 (78.26)
Edad en primera relación sexual		
Primera relación activa (prom +/-DS)	18.3 +/- 4.2	18.0 +/- 3.47
Primera relación receptiva (prom +/-DS)	16.7 +/- 6.6	16.45 +/- 6.1
Actual pareja permanente	21 (67.74)	16 (69.56)

Detección de VPH por citología

Si bien las muestras tuvieron en ocasiones problemas de fijación y contaminación por materia fecal, el material recolectado fue adecuado para el diagnóstico citológico. Los resultados de estas pruebas se muestran en la cuadro 3. La infección por VPH se identificó en la citología por la presencia de koilocitos en las células de descamación del canal anal. Estos se observan como células del epitelio plano con binucleación, crecimiento nuclear y halos perinucleares.²³ Mediante este método, la infección por VPH fue detectada en 12 muestras (38.7%). Solo una de ellas presentó displasia moderada (LSIL) con infección por VPH. Los casos que presentan inflamación inespecífica, no se relacionan con VPH ya que pueden deberse a infecciones bacterianas o a padecimientos proctológicos no infecciosos.

Cuadro 2b. Características de la población estudiada y de los pacientes VPH+.

Características de la población	Población total N=31 N (%)	Población VPH+ N= 23 N (%)
Datos de la entrevista		
Número de parejas sexuales (mes)		
0	8 (25.8)	6 (26.08)
1	16 (51.61)	11 (47.82)
2 a 5	5 (16.13)	4 (17.39)
5 a 10	2 (6.45)	2 (8.69)
Número de parejas sexuales (año)		
0	2 (6.45)	3 (13.04)
1	10 (32.25)	6 (26.08)
2 a 10	17 (54.84)	12 (47.83)
10 a 50	2 (6.45)	2 (8.69)
Uso de:		
Tabaco		
nunca	12 (38.71)	10 (43.47)
actualmente	15 (48.39)	10 (43.47)
solía	4 (12.91)	3 (13.04)
Crema anales (corticoesteroides)	20 (64.52)	16 (69.56)
Historia de:		
Condilomas anales	8 (25.80)	7 (30.43)
Verrugas anales	9 (29.03)	8 (34.78)
Fístulas o fisuras	3 (9.68)	1 (4.34)
Úlceras anales	2 (6.45)	2 (8.69)
Proctitis	6 (19.35)	3 (13.04)
Enfermedades de transmisión sexual	13 (41.93)	7 (30.43)
Sífilis	3 (9.68)	3 (13.04)
Gonorrrea	7 (22.58)	3 (13.04)
Clamidia	2 (6.45)	—
Herpes genital	3 (9.68)	2 (8.69)
Sangrado anal		
nunca	10 (32.25)	6 (26.08)
a veces	17 (54.84)	14 (60.86)
casi siempre	4 (12.9)	3 (13.04)

Detección de VPH por Captura de Híbridos II

Para la validación de la prueba, se utilizaron tanto controles positivos como negativos por triplicado. La media de los controles debe cumplir ciertos criterios para que la prueba sea válida:

- La media de los calibradores negativos debe de ser menor a 250 RLU
- La razón CP/CN debe ser mayor a 2

- Tanto el calibrador positivo, como el negativo, deben mostrar un coeficiente de variación (C.V.) menor o igual al 25%

Como se muestra en los cuadros 4a y 4b, estos parámetros se cumplieron tanto para la prueba A ("bajo" riesgo) como para la prueba B ("alto" riesgo), por lo que los resultados se consideraron válidos. En ambos casos, el valor de corte corresponde a la media de los controles positivos. Para establecer si una muestra es positiva o

negativa, se divide su valor de RLU entre el valor de corte, si el resultado es igual o mayor a 1, se considera positiva, mientras que si es menor, es negativa.

En relación a la detección del ADN de VPH por captura de híbridos, 23 de los 31 pacientes estudiados fueron positivos para algún tipo viral (Cuadro 3), por lo que la prevalencia total encontrada fue de 74.2%. Cabe mencionar que esta prueba permite la detección de 18 tipos distintos de VPH en dos grupos; la prueba A incluye 5

Cuadro 3. Resultado de la citología, de la prueba de VPH por Captura de Híbridos de "bajo" (A) y "alto" riesgo (B). La columna de los resultados de "alto" riesgo se encuentra ordenada en orden ascendente de RLU/CP

No. de muestra	CITOLOGIA		VPH POR CAPTURA DE HIBRIDOS			
	Diagnóstico	VPH	BAJO RIESGO (A)		ALTO RIESGO (B)	
			RLU/CP	RESULTADO	RLU/CP	RESULTADO
180	sin alteraciones	-	0.6	-	0.42	-
189	sin alteraciones	-	1.37	pos	0.44	-
188	sin alteraciones	-	0.49	-	0.45	-
194	sin alteraciones	-	0.64	-	0.47	-
182	candidiasis	-	0.51	-	0.48	-
195	koilocitos	pos	0.57	-	0.53	-
185	inflamación inespecífica/ bacilos	-	0.43	-	0.57	-
190	inflamación inespecífica/ moco	-	0.58	-	0.59	-
201	alteraciones inflamatorias/ bacterias	-	0.87	-	0.62	-
181	koilocitos	pos	1628.01	pos	0.94	-
207	koilocitos	pos	0.53	-	2.26	pos
203	sin alteraciones	-	122.57	pos	2.93	pos
193	alteraciones inflamatorias/ bacilos	-	1112.5	pos	2.98	pos
197	alteraciones inflamatorias	-	181.89	pos	41.86	pos
202	koilocitos/ células con pérdida de relación núcleo:citoplasma					
	Displasia moderada	pos	1.17	pos	93.6	pos
192	sin alteraciones	-	0.53	-	115.92	pos
187	sin alteraciones	-	20.72	pos	166.85	pos
184	koilocitos	pos	121.96	pos	170.71	pos
204	koilocitos	pos	1333.92	pos	341.76	pos
208	sin alteraciones	-	0.62	-	342.88	pos
196	koilocitos	pos	186.47	pos	589.74	pos
199	sin alteraciones	-	270.3	pos	609.06	pos
183	koilocitos	pos	1290.75	pos	807.43	pos
205	koilocitos	pos	1222.45	pos	823.31	pos
209	alteraciones inflamatorias	-	492.88	pos	957.07	pos
198	koilocitos	pos	613.16	pos	1308.74	pos
200	sin alteraciones	-	43.59	pos	1345.68	pos
206	sin alteraciones	-	21.98	pos	1437.38	pos
191	alteraciones inflamatorias	-	1232.24	pos	1581.94	pos
186	koilocitos	pos	806.4	pos	1838.55	pos
210	koilocitos	pos	83.36	pos	2308.98	pos

Cuadro 4a. Validación para la prueba de VPH “bajo” riesgo (A).

*De acuerdo con el método de validación, este valor se eliminó para el resto de los cálculos

	CN RLU	CP RLU
	273*	137
	69	175
	71	125
Media	70	145.7
C.V. %	2.0	17.9
CP/CN	2.08	

Cuadro 5. Resultados generales de la prueba de captura de híbridos

		Número de muestras	%
VPH - A+	“BAJO” RIESGO	20	64.52
VPH - B +	“ALTO” RIESGO	21	67.74
VPH - A o VPH - B +	UNO U OTRO	23	74.19
VPH - A y VPH - B +	AMBOS	18	58.06
VPH -	NINGUNO	8	25.81

tipos (6/11/42/43/44) del grupo denominado de “bajo” riesgo y la prueba B incluye 13 tipos (16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/ 59/68) de riesgo “alto” e “intermedio”. La prevalencia para los tipos de “bajo” riesgo detectados por la prueba A fue de 64.5% y 67.7% para aquellos de “alto” riesgo detectados por la prueba B (Cuadro 5).

El método de captura de híbridos puede ser utilizado para medir de manera semicuantitativa la cantidad de ADN de VPH presente en la muestra. En el trabajo de Sun y colaboradores clasifican los valores de RLU/CP en valores de 1 a 4.9 como 1+, aquellos de 5 a 20, como 2+, y los valores por arriba de 20, como 3+. ²⁴ Siguiendo esta clasificación encontramos que mientras el 14% de las muestras positivas a la prueba B fueron 1+, el 86% 3+. En cuanto a las positivas a la prueba A, el 10% fue 1+ y el 90% fue 3+ (Cuadro 3), esto nos indica que la mayoría de los sujetos tienen gran carga de ADN de VPH.

Se analizó la relación entre la carga viral de VIH y la presencia de VPH, más no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa.

En cuanto a la multiplicidad de tipos, dieciocho pacientes de 31 (58%), fueron positivos en ambas pruebas (VPH B “alto” y A

Cuadro 4b. Validación para la prueba de VPH “alto” riesgo (B)

	CN RLU	CP RLU
	66	152
	84	200
	68	164
Media	72.7	172
C.V. %	13.6	14.5
CP/CN	2.37	

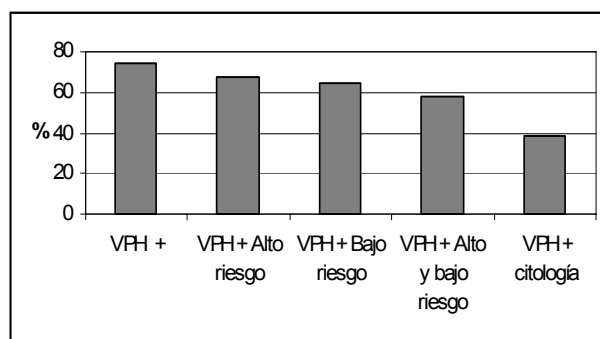


Figura 1. Porcentaje de muestras positivas para el Virus de Papiloma Humano

“bajo” riesgo oncogénico), lo que nos asegura que están infectados por más de un tipo de VPH. Sin embargo, es probable que exista infección múltiple que involucre tipos virales del mismo riesgo oncogénico, lo cual no se detecta por el método de captura de híbridos. La prueba A identifica 5 tipos diferentes y la B a 13, por lo que para ver los diferentes tipos de VPH se necesitaría un análisis de tipificación por PCR. Hay varios estudios que relacionan la infección múltiple por VPH con la inmunosupresión por VIH. ^{11, 8} En nuestro estudio encontramos una mayor proporción de pacientes positivos (66.7 %, de 18) para ambas pruebas, cuya cuenta de células CD4 es menor de 500 células/mL, sin embargo estos datos no fueron estadísticamente significativos.

Relación de resultados de la prueba citológica y la captura de híbridos para VPH

De los 31 pacientes estudiados, 23 fueron positivos para algún tipo de VPH. De éstos, 18 fueron positivos para ambas pruebas y 5 positivos para sólo una de ellas. En cuanto a los resultados citológicos, 12 muestras presentaron koilocitos o alteraciones por infección por VPH. Una de estas muestras no coincidió con los resultados por captura híbridos. Esto pudo deberse a que la infección es causada por un tipo de VPH no contemplado en ninguna de las dos pruebas. Otra posibilidad es que se deba a un error en la interpretación de la prueba citológica a causa de la contaminación presente.

Realizando un análisis de los resultados observamos que sólo 11 muestras fueron positivas tanto para alguna de las pruebas de captura, como para la citología. Doce muestras positivas para ADN de VPH no fueron detectadas en la prueba citológica.

La prevalencia reportada al inicio de éste capítulo (74%) fue considerando las muestras positivas a algún tipo de papiloma. La prevalencia de VPH de "alto" riesgo oncogénico (prueba B) fue muy similar a la de VPH de "bajo" riesgo oncogénico (prueba A).

En la Figura 1 se muestra de manera gráfica la prevalencia a VPH, comparada con la encontrada por la prueba citológica, la cual es de sólo 39%.

Discusión

En México existen pocos datos acerca de la prevalencia de cáncer anal y el número de estudios de esta neoplasia es limitado. La identificación de un nuevo grupo de riesgo, hombres que tienen sexo con hombres (HSH), especialmente aquellos que padecen VIH/SIDA, ha impulsado el desarrollo de nuevos protocolos de investigación.

La técnica de captura de híbridos para la detección de ADN de VPH, tanto de "bajo", como de "alto" riesgo, resultó ser sensible y eficaz en nuestro estudio. La prevalencia obtenida para algún tipo de VPH fue de 74.2%. Este resultado fue menor que la prevalencia reportada en Estados Unidos, alrededor del 90%.^{7, 18} En estos estudios se utilizó la técnica de PCR y no captura de híbridos para la detección de VPH. En México no existen estudios previos con los cuales podamos comparar los resultados encontrados.

De los 23 sujetos positivos a algún tipo de VPH, el 78%,¹⁸ fueron positivos para virus de "alto" y "bajo" riesgo oncogénico, lo que nos indica la presencia de múltiples tipos de VPH en un solo paciente.

En cuanto a la carga viral de VPH medida por las RLU obtenidas, la mayoría de las muestras positivas para VPH de "alto" o "bajo" riesgo (86%) tuvieron valores de RLU/CP (media del control positivo) mayores a 20, lo que sugiere la presencia de una gran carga de ADN viral. Así mismo, se encontró una ligera asociación entre la cuenta de células CD4 y los valores de RLU/CP. Según Palefsky, estos niveles altos de RLU podrían reflejar la presencia de varios tipos virales.⁸

En nuestro estudio encontramos una asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre la presencia de VPH y la baja cuenta de células CD4. En los pacientes con alto grado de inmunosupresión (< 500 cel/mL), se observa una mayor proporción

de positivos para algún tipo de VPH, en comparación con aquellos con valores más altos (> 500 cel/mL).

Es importante resaltar el hecho de que se detectó VPH por captura de híbridos en 11 muestras que fueron reportadas sin alteraciones en el estudio citológico, por lo que podemos pensar que la detección por captura de híbridos es más sensible que la citología.

En México, el Papanicolaou anal no se realiza de rutina, por lo que al llevar a cabo esta prueba, nos enfrentamos a una serie de problemas, en especial con la toma de la muestra. El raspado anal debe ser profundo para abarcar el canal completo. La técnica de Papanicolaou tiene una serie de limitaciones; se requiere de personal capacitado y tiene menos del 100% de sensibilidad. Palefsky reportó un 80% de sensibilidad en las citologías anales realizadas a su cohorte.⁶ Por esto se recomienda que las citologías sean complementadas con una anoscopia para un diagnóstico más preciso.

La mayoría de los pacientes fueron diagnosticados como VIH+ hace aproximadamente 3 años. Todos se encuentran bajo tratamiento antiretroviral y algunos han logrado mantener niveles de células CD4 normales. Sin embargo, al ser VPH+ están en riesgo de desarrollar una lesión precancerosa o cáncer. Es por eso que se han propuesto una serie de recomendaciones clínicas para estos pacientes. Palefsky y Berry (1998) diseñaron los siguientes criterios:

- Realizar un Pap anal como parte de la evaluación inicial al momento de diagnóstico de VIH+.
- Si es normal, un segundo Pap debe realizarse a los 6 meses.
- Si ambas pruebas son normales, se recomienda su evaluación cada año (si tienen células CD4 < 500 cel/m, más seguido).
- Si alguno presenta SIL, se debe referir a anoscopia.

Con este protocolo se logra monitorear la evolución de las posibles lesiones precancerosas presentes en el canal anal, sin embargo es necesaria la detección inicial del virus por técnicas moleculares como es la captura de híbridos. A los sujetos positivos en nuestro estudio, se les aconsejó que se realizaran una citología en un año, para conocer la evolución de la infección y detectar a tiempo la aparición de lesiones precancerosas. Estos pacientes son de alto riesgo, y el hecho de ser VIH+ y presentar multiplicidad de tipos de VPH, los coloca en una posición más vulnerable al desarrollo de malignidades. Con respecto a los pacientes negativos para VPH, se les recomendó realizarse otra prueba de detección de VPH por captura de híbridos en un año.

Los padecimientos proctológicos en estos pacientes fueron comunes (hemorroides, condilomas, proctitis, fisuras y verrugas).

De 8 pacientes que presentaron historia de condilomas acuminados anales, 7 fueron positivos para algún tipo de VPH; 5 positivos para VPH de "alto" y "bajo" riesgo, 1 solo para "alto" riesgo y 1 para "bajo" riesgo. En el caso del paciente (201) con historia de condilomas anales que resultó negativo para ambas pruebas de VPH, sabemos que tuvo una remoción quirúrgica del condiloma aproximadamente hace 5 años, lo que pudo haber erradicado la infección. La prevalencia de virus de papiloma humano en el epitelio anal de la población estudiada fue de 74.2%.

La prevalencia de los tipos de papiloma humano de "alto" riesgo oncogénico fue de 67.7% y la de "bajo" riesgo de 64.5%.

En resumen el método de detección de virus de papiloma humano por captura de híbridos resultó ser muy útil, sensible y rápido.

La prueba citológica presenta algunas dificultades y es necesario contar con personal altamente capacitado para la toma de muestra, así como para su interpretación.

El método de captura de híbridos es más sensible en la detección de virus de papiloma humano que la citología, sin embargo ésta última es necesaria para la descripción de una posible lesión. Es importante su uso conjunto como herramienta de diagnóstico oportuno.

Se observó una correlación significativa entre la baja cuenta de linfocitos CD4 y la positividad al virus de papiloma humano.

Este trabajo sugiere la utilidad de pruebas de rutina para la detección de virus de papiloma humano y lesiones precancerosas en pacientes HSH y VIH positivos, para la prevención de cáncer anal.

Referencias

- Vieyra F, Luna-Pérez P, Peña J P, Rodríguez-Coria D. Características clínicas asociadas de 41 pacientes con carcinoma epidermoide de ano, estudiados en un centro de cáncer. *Rev Gastroenterol Mex* 1997; 62 (2): 89-93.
- Wexner S, Milsom J, Dailey T. The demographics of anal cancers are changing. *Dis Colon Rectum* 1987; 30: 942-946.
- Causy D, Goedert J, Palefsky J, Gonzales J, Rabkin C, DiGioia R, et al. Interaction of human immunodeficiency and papilloma viruses: Association with anal epithelial abnormality in homosexual men. *Int J Cancer* 1990; 46: 214-219.
- Critchlow C, Surawicz C, Colmes K, Kuypers J, Daling J, Hawes S, et al. Prospective study of high grade anal squamous intraepithelial neoplasia in a cohort of homosexual men: influence of HIV infection, immunosuppression and human papillomavirus infection. *AIDS* 1995; 9: 1255-1262.
- Melbye M, Palefsky J, Ryder L, Nielsen H, Bergmann O, Pindborg J, Biggar R. Immune status as a determinant of human papillomavirus detection and its association with anal epithelial abnormalities. *Int J Cancer* 1990; 46: 203-206.
- Palefsky J, Berry M. Pathogenesis and Clinical Manifestations of HIV-Associated Anogenital Neoplasia. The AIDS Knowledge Base Education. 1988. Página web: <http://HIVinSite.usf.edu/akb/1997/07analca/index.html>
- Palefsky J. Anal squamous intraepithelial lesions: Relation to HIV and human Papillomavirus infection. *JAIDS* 1999; 21: s42-s48.
- Palefsky J, Holly E, Ralston M, Jay N. Prevalence and risk factors for Human Papillomavirus infection of the anal canal in human immunodeficiency virus (HIV)- positive and HIV-negative homosexual men. *J Infect Dis* 1998b; 177: 361-367.
- Goldie S, Kuntz K, Weinstein M, Freedberg K, Welton M, Palefsky J. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of screening for anal squamous intraepithelial lesions in homosexual and Bisexual HIV-Positive Men. *JAMA* 1999; 281: 1822-1829.
- Holm R, Tanum G, Karlsen F, Nesland M. Prevalence and physical state of human papillomavirus DNA in anal carcinoma. *Mod Path* 1994; 7 (4): 449-53.
- Palefsky J, Holly E, Hogeboom C, Ralston M, DaCosta M, Botts R, et al. Virologic, immunologic, and clinical parameters in the incidence and progression of anal squamous intraepithelial lesions in HIV-positive and HIV-negative homosexual men. *J Acquir Immune Defic Syndr And Human Retrovirol* 1998; 17: 314-319.
- Scheffner M, Romanczuk H, Munger K, Huibregtse J M, Mietz J A, Howley P. Function of human Papillomavirus proteins, in *Human Pathogenic Papillomaviruses*, zur Hausen: Ed. Springer-Verlag; 1994. p.83-89.
- Howley P. Role of the human papillomaviruses in human cancer. *Cancer Res* 1991; (s) 51: 5019s-5022s.
- Vousden K H. Cell Transformation by Human Papillomaviruses, in *Virus and Cancer*. Cambridge University Press: Ed. Minson A, Neil J, McCrae M; 1994.p. 27-46.
- Dewhurst S. HIV-1: Molecular Biology, 1996. Página web: <http://www.urmc.rochester.edu/smd/mbi/grad/hiv279.html>
- Palefsky J. Anogenital Neoplasia in HIV-Positive Women and Men, HIV:Advances in research and Therapy. Vol 6, No. 3, 1996. International Association of Physicians in AIDS Care: Página web: <http://www.iapac.org/clinmgt/diseases/neoplasia/anogen.html>
- Mueller N. Overview of the epidemiology of malignancy in immune deficiency. *JAIDS* 1999; 21: s5-s10.
- Friedman H, Saah A, Sherman M, Busseniers A, Blakwelder W, Kaslow R, et al. Human Papillomavirus, anal squamous intraepithelial lesions and human immunodeficiency virus in a cohort of gay men. *J Infect Dis* 1998; 178: 45-52.
- Cappiello G, Garbuglia A, Salvi R, Retzsa G, Giuliani M, Petzotti P, et al. HIV infection increases the risk of squamous intra-epithelial lesions in women with human papillomavirus infection: An analysis of HPV genotypes. *Int J Cancer* 1997; 72: 982-986.
- Lacey H B, Wilson G E, Tilsotom P, Wilkins E, Bailey A, Corbitt G, et al. A study of anal intraepithelial neoplasia in HIV positive homosexual men. *Sex Transm Infect* 1999; 75(3): 172-177.
- Lundberg G. The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. *JAMA* 1989; 262 (7): 931-934.
- Benjamin I, Echols L. The Pap Test: Cervical changes and health care. Página web: http://www.oncolink.com/spec.../gyn_onc/cervical/screening/pap_test.html. 1999.
- Cockerell C. Human Papillomavirus Infections. International Association of Physicians in AIDS Care. Página web: <http://www.iapac.org/clinmgt/diseases/cm/cm6.html> 1995.
- Sun X, Ferenczy A, Johnson D, Koulos J, Lungu O, Richart R, Wright T. Evaluation of the hybrid capture human papillomavirus deoxyribonucleic acid detection test. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 1432-1437.