

---

---

## **Signos citológicos no clásicos asociados a la infección por el virus del papiloma humano (VPH) en pacientes de Mérida, Venezuela.**

*Luisana Méndez Toro<sup>1</sup>, Andry Rodríguez Meza<sup>1</sup>, Mercedes López de Sánchez<sup>2</sup> y Morelva Toro de Méndez<sup>2</sup>.*

<sup>1</sup>Unidad Educativa “Colegio Teresa Titos”.

<sup>2</sup>Cátedra de Citología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

**Palabras clave:** cáncer, cuello uterino, VPH, prevalencia, citología.

**Resumen.** El objetivo de esta investigación fue identificar aquellos signos citológicos no clásicos que permitan predecir la infección por virus papiloma humano (VPH) en este medio. Se revisaron los resultados citológicos de las pacientes que acudieron a consultas ginecológicas públicas y privadas, entre enero de 2006 y diciembre de 2008. Las muestras citológicas fueron informadas según los criterios establecidos por el Sistema Bethesda 2001 y se seleccionaron los informes con interpretación citológica de Lesión Intraepitelial Escamosa de bajo grado/VPH (LIEBG/VPH). De la hoja de solicitud de citología se tomaron los datos de edad y características citológicas. Se revisaron 25.565 resultados citológicos, de los cuales 291 eran LIEBG/VPH. La edad promedio de las pacientes fue de 32,01 años y el rango de edad varió entre 15 y 67 años. El 55,10% de las pacientes fueron menores de 30 años de edad. El coilocito fue el signo citológico viral más frecuente (66,1%). Entre los signos no clásicos asociados a la infección por VPH se observaron en orden de frecuencia: megalocariosis (44%), megalocitosis (38,5%), seguidos de la binucleación y cromatina granula fina ligeramente irregular, en igual proporción (33,7%) y las células de paraqueratosis (33,3%). La hiperromasia nuclear discreta y las células de hiperqueratosis fueron los criterios morfológicos menos frecuentes (28,5%). Los signos indirectos significativamente asociados a la infección fueron: binucleación, cromatina ligeramente irregular, hiperromasia nuclear discreta y células de paraqueratosis. La combinación de cambios morfológicos no clásicos asociadas a la infección por VPH permitiría la identificación de una elevada proporción de pacientes con esta infección, aumentando así la sensibilidad del estudio citológico en la detección del VPH y la posibilidad de seleccionar subgrupos de riesgo para el desarrollo de lesión cervical y su evaluación clínica oportuna.

**HPV infection associated with nonclassic cytological signs in patients from Mérida, Venezuela.***Invest Clin 2011; 52(2): 162 - 169***Key words:** cancer, cervix, HPV, prevalence, cytology.

**Abstract.** The purpose of this work was to identify those nonclassic cytological signs that would allow the prediction of human papillomavirus (HPV) infection. Cytology samples taken from outpatients that attended public and private gynecological practices, between January of 2006 and December of 2008, were studied. The cytological samples were informed following the criteria of the Bethesda system 2001. Those reports with a cytological interpretation of low-grade squamous intraepithelial lesion/HPV (LSIL/HPV) were selected. Age data and other cytologic characteristics were also taken. 25,565 Pap smears were revised, of which 291 were LSIL/HPV. The age average of the patients was 32.01 years and the age range was between 15 and 67 years. 55.10% of the patients were below 30 years of age. The koilocytosis was the most frequent viral cytological sign (66.1%). Among the HPV infection associated nonclassic cytologic signs were in order of frequency: nuclear enlargement (44%), megalocytosis (38.5%), followed by binucleation and lightly irregular chromatin distribution, in the same proportion (33.7%) and the typical parakeratotic cells (33.3%). Discreet nuclear hyperchromasia and hiperkeratotic cells were the less frequent morphological changes (28.5%). The indirect signs significantly associated to the infection were: binucleation, lightly irregular chromatin distribution, discreet nuclear hyperchromasia and parakeratotic cells. The combination of HPV infection associated with nonclassic cytological signs would allow the identification of a high proportion of patients with this infection, increasing in this way the sensibility of the cytological study in the detection of HPV and the possibility of selecting subgroups at risk for the development of cervical lesions and their opportune study.

*Recibido: 18-01-2011; Aceptado: 07-04-2011.*

**INTRODUCCIÓN**

Las evidencias epidemiológicas y moleculares han establecido que la infección persistente por ciertos tipos de virus papiloma humano (VPH), considerados de alto riesgo oncogénico (VPHAR), es el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de cuello uterino y sus lesiones precursoras (1,2). En Venezuela, esta neoplasia es la primera causa de mortalidad por cáncer en la mujer, constituyendo un problema de sa-

lud pública. Cada año mueren alrededor de 1.600 mujeres por esta neoplasia (3).

La mayoría de las infecciones por VPH involucran espontáneamente y sólo alrededor del 10% de la población podría presentar secuencias de ADN viral en el tejido cervical normal, sin provocar alteraciones celulares evidentes (4). En estas pacientes, la infección por VPHAR representaría entonces, un mayor riesgo de carácter silente, para el desarrollo de lesiones en el cuello uterino clínicamente significativas (5, 6).

La presencia de coilocitos y/o disqueratocitos se consideran los hallazgos citomorfológicos clásicos de la infección por VPH ó lesión intraepitelial escamosa de bajo grado/LIEBG (7,8). Sin embargo, este virus podría inducir la aparición de cambios celulares que son incluidos actualmente en el sistema Bethesda dentro de las atipias en células escamosas de significado indeterminado (ASC-US) y han sido considerados signos indirectos o no clásicos de la infección por VPH. Entre estos signos se incluyen la binucleación, megalocariosis, cromatina ligeramente irregular, células de hiperqueratosis y paraqueratosis, hiperromasia nuclear y megalocitosis (9-13).

La consideración de los signos no clásicos asociados a la infección por VPH durante el análisis citomorfológico podría incrementar la sensibilidad de la citología para la detección del virus, antes de que este produzca alteraciones celulares específicas, sirviendo por tanto de posibles indicadores de infección por VPH (14), sobre todo cuando la detección molecular del genoma viral aún no se realice en forma rutinaria dentro de los programa de pesquisa de cáncer.

El objetivo de este estudio fue identificar los cambios celulares que se encuentran asociados a la infección por VPH que permitan predecir su presencia e incrementar la detección temprana de esta infección viral.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material

Se revisaron los informes de las citologías de cuello uterino de las pacientes que acudieron a diferentes consultas ginecológicas, públicas y privadas, del municipio Libertador del estado Mérida-Venezuela, entre enero del 2006 y diciembre del 2008.

### Metodología

Para la toma de muestra citológica se utilizó espátula de Ayre y cepillo endocervi-

cal e inmediatamente fueron fijadas con fijador en aerosol. Posteriormente fueron coloreadas con la técnica de Papanicolaou modificada y analizadas e informadas considerando los criterios establecidos por el Sistema Bethesda 2001 para el informe de los hallazgos de la citología cervicovaginal (7).

Se seleccionaron aquellos resultados con interpretación citológica de lesión intraepitelial escamosa de bajo grado/VPH (LIEBG/VPH). Se revisaron tanto los informes citológicos como las láminas para confirmar la presencia de características citológicas clásicas y los signos no clásicos asociados a VPH: coilocitos, disqueratocitos, células de hiperqueratosis y paraqueratosis, binucleación, hiperromasia discreta, cromatina granular fina de distribución ligeramente irregular, megalocitosis y megalocariosis (aumento del tamaño nuclear 2 a 3 veces el tamaño del núcleo de una célula intermedia normal).

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 7.0. Se determinaron las frecuencias y el test de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) fue utilizado para correlacionar las variables incluidas en este estudio. Un valor *p* igual o menor a 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

En el período comprendido entre enero del 2006 y diciembre de 2008 fueron procesadas 25.565 citologías de cuello uterino, de las cuales 291 fueron informadas como LIEBG/VPH.

Las pacientes se encontraban en el rango de edad comprendido entre 15 y 67 años, con una media de 32,01 años y desviación estándar igual a  $\pm 11,87$  años. La mayor proporción de las pacientes (161/291) tenían menos de 30 años (55,10%) y de éstas, el 19,5% eran menores de 20 años (57 casos). El resto de las pacientes se distribuyeron entre los grupos de 31 a 40 años

(18,8%) y entre 41 y 50 años (17,8%). Una minoría de casos que correspondió a 18 pacientes (7,4%) tenían más de 50 años de edad (Fig. 1).

De las 291 citologías positivas para infección por VPH, el 69,1% de los casos mostraron la presencia de coilocitos, seguido del 44,7% en los que se observó la combinación de coilocitos y disqueratocitos; 5,1% de las muestras citológicas presentaron solo disqueratocitos (Tabla I, Fig. 2A).

La distribución de las frecuencias con que se presentaron los signos no clásicos de la infección por VPH en las citologías incluidas en este estudio se muestra en la Tabla II. Los más frecuentes fueron la megalo-cariosis (44%) y la megalocitosis (38,5%), seguidos de la binucleación y cromatina ligeramente irregular, en igual proporción (33,7%) y las células de paraqueratosis (33,3%). La hiperromasia nuclear leve y las células de hiperqueratosis fueron los criterios morfológicos menos frecuentes (28,5%).

La asociación entre los signos no clásicos y la presencia de coilocitos o disqueratocitos se presenta en la Tabla III. La binucleación (Fig. 2D), cromatina ligeramente irregular y la hiperromasia nuclear leve (Figs. 2E y 2F) se asocian significativamente a la presencia tanto de los coilocitos como de los disqueratocitos (Figs. 2B y 2C). Las células de paraqueratosis se encontraron significativamente asociados a la presencia de coilocitos ( $p < 0,003$ ).

## DISCUSIÓN

La detección de la infección por VPH es considerada actualmente una estrategia efectiva en la prevención del cáncer de cuello uterino (12). Debido a la relación causal que involucra al VPH en la carcinogénesis del cuello uterino, y que la pesquisa de esta neoplasia y sus precursores se lleva a cabo mediante programas organizados basados en la citología, se considera importante au-

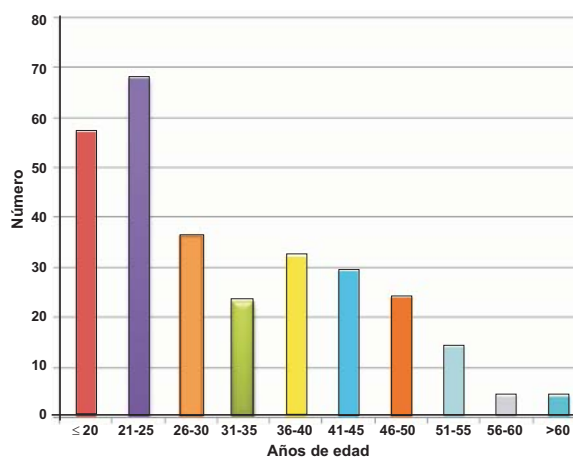


Fig. 1. Distribución de las pacientes de acuerdo a la edad.

**TABLA I**  
FRECUENCIA DE LOS SIGNOS CLÁSICOS DE LA INFECCIÓN POR HPV EN LAS CITOLOGÍAS DE CUELLO UTERINO DE ESTE ESTUDIO

| Signos clásicos de HPV       | Citologías n° (%) |
|------------------------------|-------------------|
| Coilocitos                   | 201 (69,1)        |
| Disqueratocitos              | 75 (25,8)         |
| Coilocitos y disqueratocitos | 15 (5,1)          |
| Total                        | 291 (100)         |

mentar la sensibilidad del estudio citológico para la identificación de pacientes con infección por VPH (11).

En general, las pacientes jóvenes sexualmente activas y menores de 30 años de edad presentan una mayor prevalencia de infección por VPH (13, 14). Los resultados de este estudio apoyan esta información ya que 55,1% de las pacientes con infección por VPH se encontraban por debajo de los 30 años y casi el 20% eran jóvenes menores de 20 años, lo cual las convierte en un subgrupo clínico particularmente importante en esta región, que debe ser vigilado para evitar que la infección por un VPH oncogénico evolucione a una lesión clínicamente significativa.



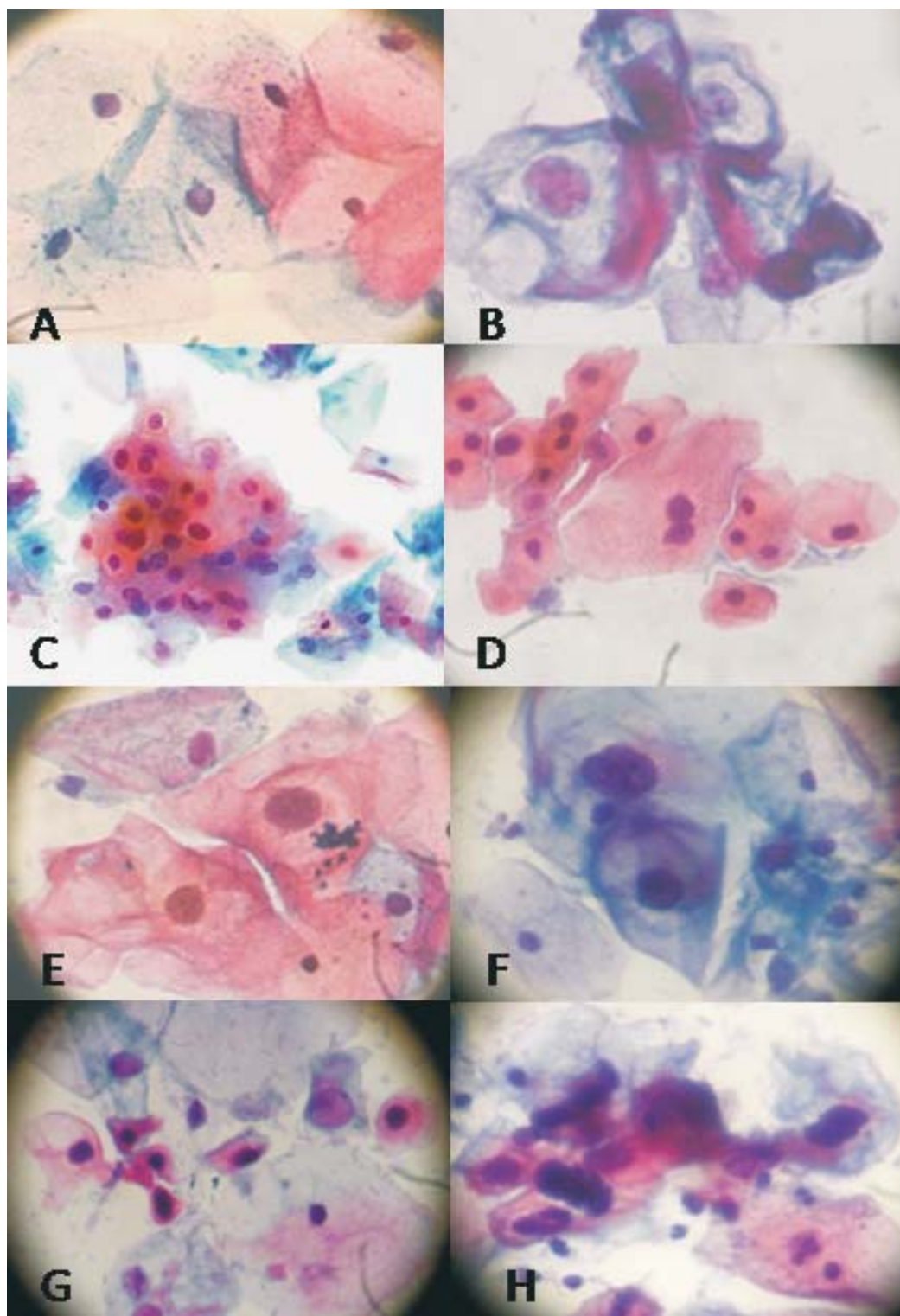


Fig. 2. Citología de la infección por VPH en cuello uterino. A. células escamosas normales (40X); B. coilocito (40X); C. disqueratocito (10X); D. binucleación (10X); E. hiperchromasia leve y megalocariosis (10X); F. hiperchromasia leve y megalocariosis (10X); G. células de paraqueratosis (10X); H. células maduras con núcleos irregulares e hipercrómicos (10X).

**TABLA II**  
FRECUENCIAS ABSOLUTAS Y RELATIVAS DE LOS SIGNOS NO CLÁSICOS DE LA INFECCIÓN POR HPV EN LAS CITOLOGÍAS DE CUELLO UTERINO DE ESTE ESTUDIO

| Signos no clásicos de HPV       | Presente<br>n° (%) | Ausente<br>n° (%) |
|---------------------------------|--------------------|-------------------|
| Binucleación                    | 98 (33,7)          | 193 (63,3)        |
| Cromatina ligeramente irregular | 98 (33,7)          | 193 (63,3)        |
| Hiper cromasia nuclear discreta | 83 (28,5)          | 208 (71,5)        |
| Megalocariosis                  | 128 (44,0)         | 163 (56,0)        |
| Megalocitosis                   | 112 (38,5)         | 179 (61,5)        |
| Células de hiperqueratosis      | 83 (28,5)          | 208 (71,5)        |
| Células de paraqueratosis       | 97 (33,3)          | 194 (66,7)        |

**TABLA III**  
ASOCIACIÓN ENTRE LOS SIGNOS NO CLÁSICOS Y LOS CLÁSICOS DE LA INFECCIÓN POR HPV

| Signos no clásicos              | Signos clásicos  |               |                  |               |
|---------------------------------|------------------|---------------|------------------|---------------|
|                                 | Coilocitos       | Valor p       | Disqueratocitos  | Valor p       |
| Binucleación                    | 77(38,3%)        | <b>+ ,012</b> | 36(27,7%)        | <b>+ ,052</b> |
| Cromatina ligeramente irregular | 77(38,3%)        | <b>+ ,012</b> | 36(27,7%)        | <b>+ ,052</b> |
| Hiper cromasia nuclear discreta | 44(21,9%)        | <b>+ ,007</b> | 15(11,5%)        | <b>+ ,011</b> |
| Megalocariosis                  | 92(45,8%)        | 0,361         | 51(39,2%)        | <b>0,143</b>  |
| Megalocitosis                   | 82(40,8%)        | 0,288         | 43(33,1%)        | <b>0,089</b>  |
| Células de hiperqueratosis      | 60(29,9%)        | 0,455         | 40(30,8%)        | <b>0,447</b>  |
| Células de paraqueratosis       | <b>78(38,8%)</b> | <b>!,003</b>  | <b>43(33,1%)</b> | <b>0,934</b>  |

La sensibilidad de la citología para la detección del VPH depende de varios factores, que incluyen al propio agente causal. En la infección activa, con una alta carga viral, se producen cambios celulares característicos, lo cual permitiría realizar su diagnóstico con elevada sensibilidad y especificidad. Por el contrario, si el virus se encuentra en un bajo número de copias es posible que solo se logren observar algunos cambios morfológicos provocados por el VPH (11, 13, 16).

En pacientes jóvenes, aproximadamente la mitad de los casos de infección por VPH es transitoria (14) y las manifestacio-

nes citológicas de esta infección podrían ser benignas y sutiles, incluyendo cambios nucleares leves y queratinización citoplasmática (11, 15, 17, 18). Varios de estos cambios celulares podrían encontrarse significativamente asociados a la presencia del virus del papiloma y muchos de ellos inclusive a VPH de alto riesgo oncogénico (13). Contrario a este estudio, en esas investigaciones se realizó la tipificación de los VPH presentes en las muestras, lo cual permitió correlacionar una gama de cambios citomorfológicos diferentes, de manera individual, con la presencia de diferentes tipos virales. De igual forma, las poblaciones estu-

diadas y las características epidemiológicas de las mismas también fueron diferentes a las del presente estudio. Considerando entonces estas diferencias, sería conveniente llevar a cabo futuras investigaciones que incluyan un mayor número de casos, así como las pruebas moleculares para detectar VPH y de esta forma validar los hallazgos de este estudio, que permitirían completar la definición de grupos de riesgo para infección por VPH en base a los hallazgos citológicos no clásicos de LIEBG, en este medio.

Entre los cambios morfológicos significativamente asociados a la infección por VPH se encuentran principalmente la bi y multinucleación, la hiper cromasia nuclear y las células paraqueratosis, en combinación con otras atipias celulares (11, 13, 15, 17, 19, 20). En este estudio, algunos de estos cambios morfológicos se encontraron significativamente asociados a la presencia de coilocitos y disqueratocitos.

Estos hallazgos nos permiten entonces indicar que su presencia podría considerarse sugestiva de infección por VPH (10,13). En otros estudios, la binucleación y la hiper cromasia parecen ser cambios significativamente asociados a la presencia de ADN viral (10, 11, 15, 17).

Las células de hiperqueratosis y de paraqueratosis son hallazgos que pueden encontrarse asociados a diferentes condiciones benignas del cuello uterino. Sin embargo, estos tipos de células también podrían estar asociadas a VPH de alto riesgo oncogénico y displasias (20), por lo que se sugiere que estos cambios podrían contribuir en la selección de pacientes de riesgo para enfermedad cervical que requieren de mayor seguimiento clínico (11, 13). En este estudio, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre las células de paraqueratosis y los signos clásicos de VPH (coilocitos y disqueratocitos). Estos hallazgos permiten reafirmar que la presencia de este tipo de células queratinizadas, junto

con otras alteraciones celulares, podrían considerarse marcadores de LIEBG y su presencia requeriría de la realización de pruebas moleculares disponibles para la detección de ADN viral en estas pacientes, lo cual permitiría confirmar o descartar su asociación con el VPH.

El aumento del tamaño nuclear o megalocariosis fue un signo citomorfológico muy frecuente entre las citologías compatibles con VPH de este estudio, como ya había sido señalado por Meisels y Fortín en 1976 (9).

En este medio, son pocos los trabajos realizados en esta área. En 1996, Rodríguez y Cordero (21) determinaron la prevalencia de la infección por VPH en 11.038 citologías así como los cambios celulares más frecuentemente asociados al VPH y concluyeron que entre los signos no clásicos que pueden tomarse en consideración para aumentar la sensibilidad de la citología en el diagnóstico del VPH se encuentran la hiperqueratosis, paraqueratosis, binucleación, megalocariosis y megalocitosis, lo cual coincide parcialmente con este estudio.

Los hallazgos de este estudio permiten suponer que la combinación de cambios morfológicos no clásicos asociados a la infección por VPH permitiría predecir su presencia y por ende, la identificación de una elevada proporción de pacientes con esta infección (15), aumentando así la sensibilidad del estudio citológico en la detección del VPH y la posibilidad de seleccionar subgrupos de riesgo para el desarrollo de lesión cervical y su evaluación clínica oportuna.

## REFERENCIAS

1. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189:12-19.

2. **Bosch FX, Muñoz N.** The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res.* 2002; 89:183-190.
3. **Capote LG.** Aspectos epidemiológicos del cáncer en Venezuela. *Rev Venez Oncol* 2006; 18 (4):269-281.
4. **De Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX.** Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7(7):453-459.
5. **Liaw KL, Glass AG, Manos MM, Greer CE, Scott DR, Sherman M, Burk RD, Kurman RJ, Wacholder S, Rush BB, Cadell DM, Lawler P, Tabor D, Schiffman M.** Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:954-960.
6. **Zielinski GD, Snijders PJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, van der Linden HC, Runsink AP, de Schipper FA, Meijer CJ.** HPV presence precedes abnormal cytology in women developing cervical cancer and signals false negative smears. *Br J Cancer* 2001; 85(3):398-404.
7. **Solomon D, Nayar R.** The Bethesda system for reporting cervical cytology. Definitions, criteria, and explanatory notes. 2º Ed. 2004. pp:91-98.
8. **Meisels A, Morin C.** Human Papillomaviruses. En: *Modern Uterine Cytopathology. Moving to the molecular smear.* ASCP Press. Chicago, IL. 2º Ed. 2007. pp:169-200.
9. **Meisels A, Fortin R.** Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol* 1976, 20(6):505-509.
10. **Morin C, Bairati I, Bouchard C, Fortier M, Roy M, Moore L, Meisels A.** Cytologic predictors of cervical intraepithelial neoplasia in women with an ASCUS Pap smear. *Acta Cytol* 2000; 44:576-586.
11. **Bollmann M, Bánkfalvi A, Trosic A, Speich N, Schmitt C, Bollmann R.** Can we detect cervical human papillomavirus (HPV) infection cytomorphology alone? Diagnostic value of non-classic cytological signs of HPV effect in minimally abnormal Pap tests. *Cytopathology* 2005; 16:13-21.
12. **Davey DD.** Update on Atypical Squamous Cells. *Cytopathology* 2005; 9:124-129.
13. **Steinman S, Smith D, Chandler N, Dhurandhar B, Di Filippo L, Scheiber-Pact M, Mody D,** Morphologic, Patient and Interpreter Profiles of High-Risk Human Papillomavirus-Positive vs.- Negative Cases of Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance. *Acta Cytol* 2008; 52: 279-285.
14. **Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD.** Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338:423-428.
15. **Schneider A, Meinhardt G, de Villiers EM; Gissmann L.** Sensitivity of the cytologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with HPV-DNA hybridization studies. *Diagn Cytopathol* 1987; 3:250-255.
16. **Moscicki A-B, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL.** Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 2006; 24(Suppl 3):42-51.
17. **Cecchini S, Confortini M, Bonardi L, Cipparrone G, Galante L, Iossa A, Ciatto S.** "Nonclassic" cytologic signs of cervical condyloma. A case-control study. *Acta Cytol* 1990; 34:781-784.
18. **Chuaqui R, Verni J.** Diagnosis of human papillomavirus infections in cervical cytology in the absence of classical signs. *Rev Chil Obstet Ginecol* 1993; 58:304-309.
19. **Cramer HM, Skinner-Wannemuehler SE, Brown DR, Katz BP, Fife KH.** Cytomorphologic correlates of human papillomavirus infection in the "normal" cervicovaginal smear. *Acta Cytol* 1997; 41:261-268.
20. **Zahn CM, Askew AW, Hall KL, Barth WH.** The significance of hyperkeratosis/parakeratosis on otherwise normal Papanicolaou smears. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 997-1001.
21. **Rodríguez F, Cordero YM.** Infección Genital por VPH. Aspectos Citológicos. [Trabajo de grado]. Mérida: Universidad de Los Andes; 1996.