

## APORTES DE LA ULTRAESTRUCTURA DEL EXOCERVIX EN LESIONES DE BAJO GRADO. RESULTADOS PRELIMINARES.

CONTRIBUTIONS OF THE ULTRASTRUCTURE FROM THE EXOCERVIX IN LOW DEGREE INJURIES. PRELIMINARY RESULTS.

Rosa Contreras H.<sup>1</sup> Olivar Castejon<sup>2</sup>

### ABSTRACT

*A descriptive study was carried out with the aim of describing the ultra-structure from the exocervix in precancerous lesions, using the gynecological liquid-based cytology technique, and comparing the cells with optical and electronic microscopy at the primary assistant - public health center of San Pedro, in the Uribante municipality, Tachira state; to a 38-year-old patient, who reported having presented menstruation during 10 days, with an ulcerative lesion at 12 o'clock in the cervix, reporting a low-grade intraepithelial lesion, by a light-microscopy and scanning electron microscopy with result of Human Papilloma Virus type 16. The results refer, that the superficial and intermediate cells present changes in the nuclear chromatin, presenting a decompaction of the localized heterochromatin, in the internal surface of the nuclear membrane, which is visible either by optical microscopy (lax chromatin) or by electronic (uncoiled chromatin). This finding could be considered pathognomonic of precancerous lesion; therefore, nuclear chromatin must be described in all cytological reports, which will allow defining all existing cases, and eliminating false positives caused by other infectious agents that do not affect the cellular genome, as the human papilloma virus does it because of its predilection for nuclear DNA.*

**KEY WORDS:** nuclear chromatin, precancerous lesion, exocervix.

### RESUMEN

*Con el objetivo de describir la ultra estructura del exocervix en lesiones precancerosas , con la técnica de citología ginecológica de Base Líquida, y comparando las células con microscopía óptica y electrónica, se realizó un estudio descriptivo, en el ambulatorio de San Pedro, del municipio Uribante, del estado Táchira en una paciente de 38 años, que refería haber presentado la menstruación durante 10 días, con una lesión ulcerosa a las doce en cuello uterino, reportando una lesión intraepitelial de bajo grado, por microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido con resultado de Virus Papiloma Humano tipo 16. Los resultados refieren, que las células superficiales e intermedias, presentan cambios en la cromatina nuclear, presentando una descompactación de la heterocromatina localizada, en la superficie interna de la membrana nuclear, la cual es visible tanto por microscopía óptica(cromatina laxa) como electrónica (cromatina desenrollada). Este hallazgo podría considerarse patognomónico de lesión precancerosa, por tanto en todo informe citológico se debe describir la cromatina nuclear, lo que permitirá definir todos los casos existentes, y eliminar falsos positivos causados por otros agentes infecciosos que no afectan el genoma celular, como lo hace el virus papiloma humano por su predilección por el ADN nuclear.*

**PALABRAS CLAVE:** cromatina nuclear, lesión precancerosa, exocervix.

### INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece, que el cáncer de cérvix es un problema de salud pública mundial.<sup>1,2</sup> Esta patología, es la segunda

causa de muerte en el mundo en mujeres en edad fértil, con un estimado de 500.000 muertes al año.<sup>3</sup>

En Venezuela, el cáncer de cérvix representa la primera causa de muerte entre mujeres de 15 a 44 años. Datos del 2014 estiman que anualmente en Venezuela 4.973 mujeres son diagnosticadas con cáncer de cérvix, con 1.789 muertes anuales.<sup>4</sup>

Recibido: 12/2017

Aprobado: 06/2018

<sup>1</sup>Departamento de Investigación y Educación de la Corporación de Salud del Estado Táchira. <sup>2</sup>Laboratorio de microscopía electrónica, CIADANA, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Núcleo Aragua.

Correspondencia: el\_vinia1964@hotmail.com

La infección por el virus papiloma humano (VPH) de serotipos oncogénicos es el principal factor de riesgo para desarrollar la enfermedad. A nivel mundial, los datos agrupados de los estudios de casos y controles indicaron que el ADN del VPH puede ser detectado en 99,7% de casos de mujeres con diagnóstico histológico

de cáncer cervical de células escamosas en comparación con 4% de las mujeres de control.<sup>5</sup>

Actualmente, se cuenta con vacunas para efectuar prevención primaria del cáncer de cuello uterino;<sup>5</sup> no obstante, a las mujeres a las cuales se les aplica deben ser sometidas a estudios de rutina para la detección temprana de cáncer de cérvix, debido a que dichas vacunas han sido diseñadas para combatir a los virus con mayor potencial oncogénico; sin embargo, existen otros virus de menor oncogenicidad, capaces de producir cáncer.<sup>6</sup>

Otros aspectos que se deben considerar para establecer la importancia de las medidas preventivas como las vacunas, son: 1) Su eficacia, la cual está todavía en estudio, 2) el alto costo disminuye su disponibilidad en países en desarrollo y 3) la vacunación de niñas preadolescentes requiere el consentimiento de los padres lo cual supone un problema sociocultural en países en desarrollo.<sup>7</sup> De esta manera programas rutinarios de pesquisa temprana son una herramienta fundamental para detectar casos de cáncer cervical en estos países.

La OMS plantea varios requisitos que debe reunir un programa de pesquisa para ser aceptado. En primer lugar, la técnica usada debe ser sensible para identificar cambios celulares, a priori, antes que se establezca la neoplasia, en el caso del cáncer de cuello uterino, las lesiones pre malignas claramente lo anteceden, por lo que la pesquisa de este tipo de lesiones evitaría la incidencia de esta patología y disminuiría los costos de tratamiento, así como la morbilidad y la mortalidad por esta enfermedad.<sup>8</sup>

La citología ginecológica de Papanicolaou evaluada mediante el microscopio óptico, ha sido el método más usado, y data del año 1940, gracias a los aportes de Georgios Papanicolaou, y ha brindado uno de los mayores avances en el control de la enfermedad neoplásica en la Historia; sin embargo, presenta altos valores discordantes comparándolo con biopsia y colposcopia, según recientes estudios de tamizaje.<sup>9</sup> En el Reino Unido se realiza una mejor preparación de la muestra citológica en base líquida, que es un método de muestras celulares introducido en 1996.<sup>10</sup>

La principal causa del aumento de la mortalidad, por esta neoplasia, es la falta de unificación de criterios por parte de citotecnólogos y anatomopatólogos, lo cual ensombrece el pronóstico de las pacientes. Al tener un cambio cito morfológico patognomónico estandarizado, de una lesión precancerosa, se hace una pesquisa más confiable de los cambios celulares ocasionados por el VPH.<sup>11,12</sup>

Con el uso de Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) en las lesiones precancerosas del cuello uterino, se observa, como las células del exocervix presentan irregularidades en su forma, tamaño y distribución, los coilocitos se ven como una imagen de un volcán<sup>12</sup> y en las lesiones cancerosas se aprecia irregularidad de la superficie de las células, las cuales causan cambios en las propiedades de adhesión, permitiendo que se desprendan de las láminas epiteliales que junto con la división celular rápida y caótica, hace que las células lesionadas se agrupen y formen tumores que pueden invadir y destruir los tejidos circundantes.<sup>13, 14</sup>

Esta investigación enmarcada en la matriz epistémica del positivismo, se propone demostrar por Microscopía Electrónica de Barrido, que en las lesiones intraepiteliales de bajo grado, hay cambios en la cito arquitectura condensada de la heterocromatina, que es un patrón morfológico del exocervix normal.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

En el año 2015 en el Ambulatorio de San Pedro, ubicado en el Municipio Uribe del Estado Táchira, dependiente de la Corporación de Salud de esta entidad, se realizó un estudio descriptivo, en una paciente con diagnóstico de Lesión Intraepitelial de Bajo Grado, considerando los siguientes criterios de inclusión: edad entre 25 a 64 años, vida sexual activa, con detección y tipificación de VPH positiva por reacción en cadena de polimerasa (PCR); y criterios de exclusión: paciente con histerectomía, conización o cualquier otra intervención del cérvix preestablecida.

Se tomó una muestra citológica de la paciente de 35 años de edad, en etapa premenstrual, con FUR 28-12-17, gestas 2, paras1, cesáreas1, abortos 0, con citología anterior de Papanicolaou desde 3 meses, con resultado Negativo para Lesión Intraepitelial o Malignidad; de ocupación oficios del hogar, con edad de primeras relaciones sexuales a los 18 años, con frecuencia de relaciones sexuales: una por semana, número de parejas 2, preferencia sexual: heterosexual y no usa métodos anticonceptivos.

Se diseñó un instrumento para recolectar información de variables relacionadas con factores individuales (edad, menarquía, gestas, partos, cesáreas, abortos, legrado, ocupación, antecedentes de infecciones de transmisión sexual), factores conductuales (edad de primeras relaciones sexuales, frecuencia de relaciones sexuales, número de parejas, preferencia sexual, uso y métodos anticonceptivos).

Se completó el formato de citología, estructurado en cuatro secciones: Identificación, Antecedentes, Lectura e Informe citológico. Se acompañó de un consentimiento informado en el cual se hizo referencia a la finalidad del estudio, el procedimiento y práctica de la muestra, el bajo riesgo a su exposición, y la participación de entrega del resultado y la orientación pertinente.

El procedimiento, consistió en solicitar a la paciente a colocarse en posición ginecológica en una camilla y mediante la introducción de un espéculo desechable por vía vaginal, con un cepillo cervi-Brush se tomó muestra de endocervix y exocervix. Al cepillo se le dieron 3 vueltas en sentido contrario a las agujas del reloj en el líquido y se desprendió la cabeza del cepillo, la cual se dejó dentro del frasco.

Se extrajeron con pinzas estériles el cabezal de el cepillo de cervi-Brush y se desechó. Se vació el contenido del frasco en un tubo de ensayo para la muestra y se colocó en la centrifuga. Una vez colocado el tubo se cerró y se les dio un tiempo de cinco minutos a 1.500 RPM.

La centrifuga se abrió cuando se detuvo por completo. Se sacó el tubo de ensayo, se eliminó el sobrenadante dejando el sedimento. Posteriormente se procedió de la siguiente forma: Se tomó el soporte para el portaobjeto, se colocó una porta encima, un filtro que lleva un agujero en el centro, una especie de embudo y un anillo que se gira para sujetar los demás. Con una pipeta automática se depositó una gota del sedimento en el portaobjeto a través del embudo mencionado antes. Este soporte con el portaobjeto, el filtro y la gota de sedimento se colocaron en un envase cerrado que se pone en el cytospin y se le dieron 5 minutos de tiempo a 1.500 RPM. Al terminar la centrifugación se sacó y desmontó el soporte del envase en el que se quitó el filtro y se fijó con citocell. Seguidamente se tiñó el portaobjeto con la técnica convencional de hematoxilina-eosina y se cubrió igualmente con cubre objeto, quedando lista para la observación al microscopio óptico a una magnificación de 40x, por el anatomopatólogo en el Hospital del Seguro Social de La Owallera, quien dió los resultados según la clasificación Internacional de Bethesda. Esta muestra fué fotografiada y guardada para su comparación con las de microscopia electrónica.

La lámina se llevó al Laboratorio de microscopia Electrónica de CIADANA, donde se colocó en xilol por espacio de tres días, para desprender el cubreobjetos; seguidamente esta lámina se cortó con lápiz de diamante, por debajo del espesor del vidrio en cuadro de 5 x 5 mm,

el cual contenía el material a observar, se montó en el porta muestras del MEB y se pegó a este con cinta doble pegante de grafito. Posteriormente este material se llevó al Cobertor Iónico IB3 para ser cubierto por una superficie metálica de Platino-Paladio (pt-pd) de 150 Angstrom (Å).

El portaobjeto se colocó en el interior de la cámara de observación para ser visto con magnificación de 200 a 10.000 amplitudes y fotografiados desde la pantalla del MEB, con una cámara fotográfica normal HP. Estas imágenes de la cámara se llevaron al computador para ser anexadas al texto de estudio.

## RESULTADOS

La paciente examinada reportó un diagnóstico presuntivo de Lesión Intraepitelial de Bajo Grado, por microscopía óptica y electrónica de barrido y con la prueba de detección y tipificación del VPH, positiva para VPH tipo 16.

Macroscópicamente, el cuello uterino fué visto con una lesión sospechosa, caracterizada por una ulcera friable a las 12.

### Microscopía de Luz:

La estructura celular, vista por microscopio óptico a una magnificación de 40x, en la región del exocervix estudiada, se observaron, células intermedias y superficiales con núcleos aumentados de tamaño, con binucleación y halos perinucleares, con cromatina laxa (figura 1), sugestiva de infección por VPH.

### Microscopía Electrónica de Barrido:

Se observaron algunas células superficiales e intermedias, de forma y tamaños normales, pero en su mayoría se detectaron, cambios ultra estructurales de las células. En la superficie celular, se apreciaron microblebs distorsionados que no guardaban un orden secuencial, las membranas citoplasmáticas y nucleares, no continuas, con la heterocromatina nuclear desenrollada (figura 2) y ubicada en diferentes sitios, dentro del núcleo. Imágenes de volcán, que son el equivalente de los coilocitos. (figura 3) Multinucleación fué observada (figura 4) Células con núcleos aumentados de tamaño y multinucleadas (figura 5).

## DISCUSIÓN

La patogénesis de la infección por el VPH, y su efecto citopático en las células del exocervix, es un tema de gran interés en la pesquisa del cáncer de cuello uterino,

**Figura 1. Cromatina laxa de una célula intermedia. MO**



**Figura 2. Microfotografía en la que se observa cromatina laxa**

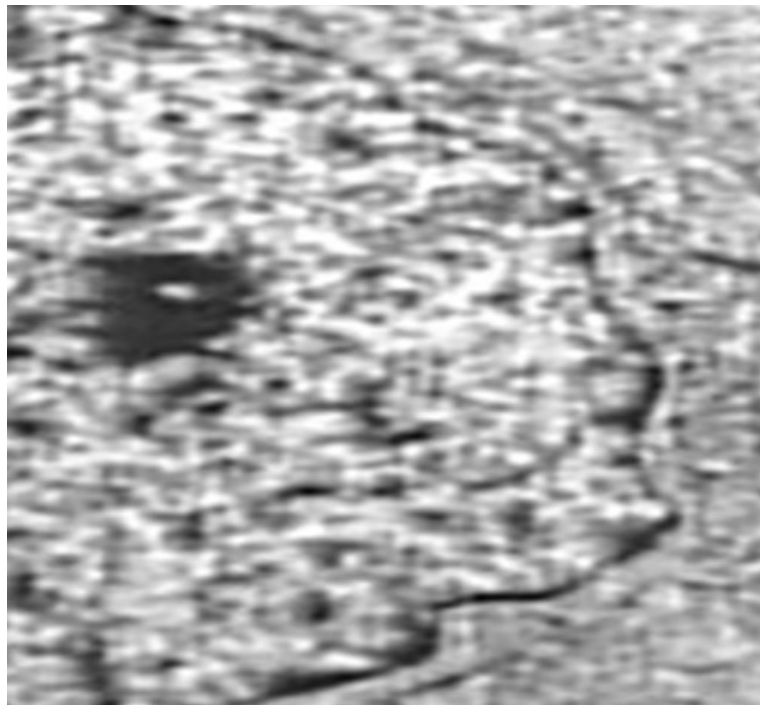


Figura 3. Microfotografía de Imagen de volcán, colocito de una célula intermedia.

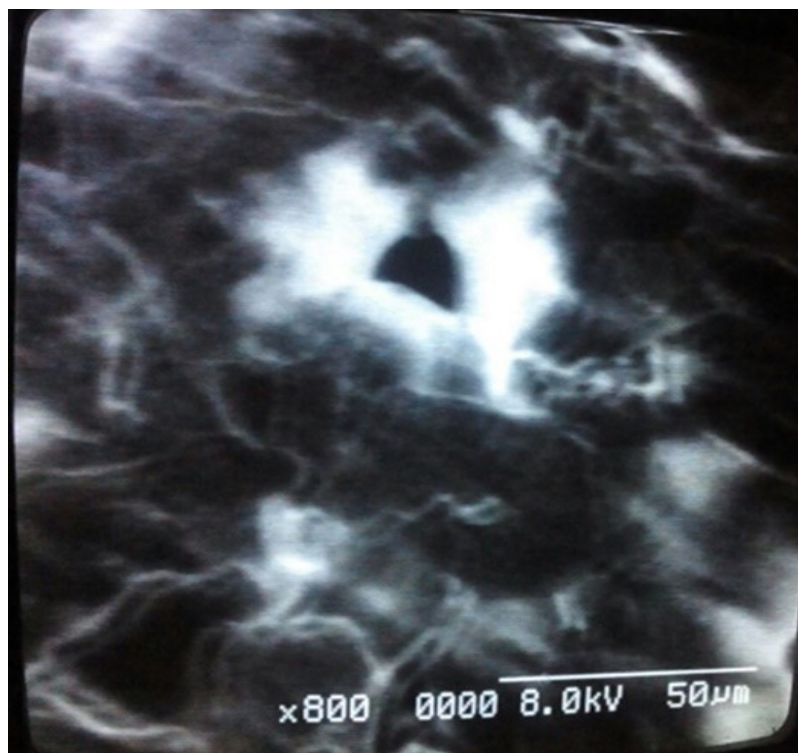
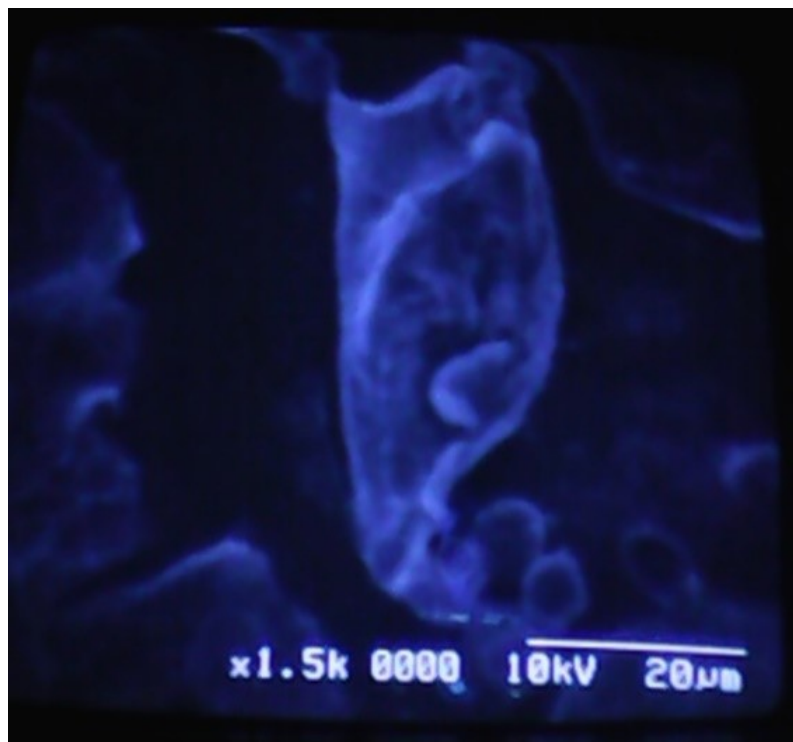
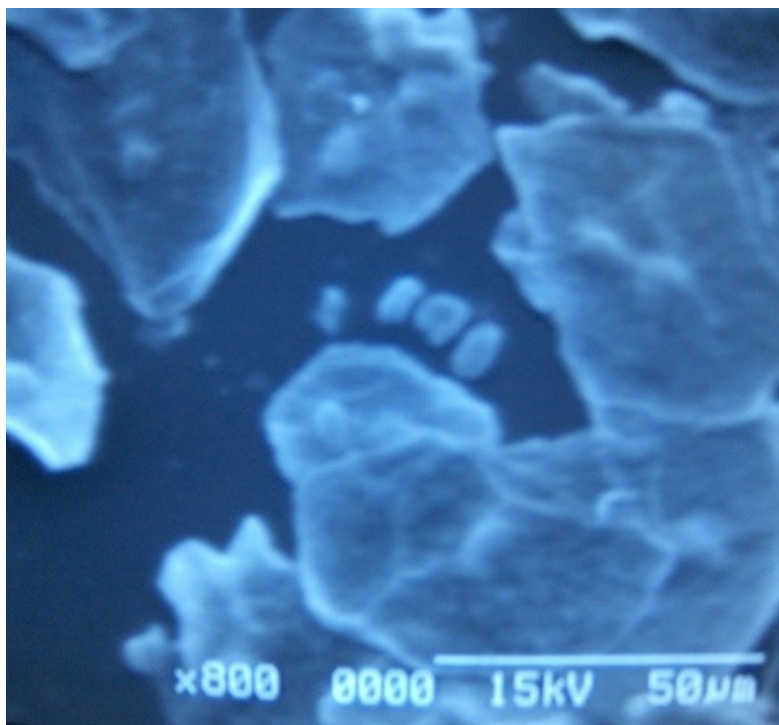


Figura 4. Célula navicular con núcleo saliendo de la célula y aumentado de tamaño.



**Figura 5 . Se observan varias células intermedias multinucleadas.**



ya que estas células ubicadas en la zona de transformación de la vagina, son el primer indicio de una lesión precancerosa, curable en un ciento por ciento, al ser detectadas a tiempo, en sus daños celulares incipientes. En este estudio, la descripción de la cromatina nuclear, como principal hallazgo de una lesión intraepitelial de bajo grado, es comparable en mayor o menor proporción, con algunos resultados reportados en distintas partes del mundo.

Rani y colaboradores realizaron un estudio retrospectivo de 60 citologías cervicales, para caracterizar las lesiones precancerosas y cancerosas cervicales mediante morfometría nuclear, encontrando que el área nuclear, el perímetro y el diámetro son parámetros estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) para diferenciar los frotis cervicales pre malignos de los malignos y refiere que la granularidad de la cromatina nuclear, es un criterio meramente subjetivo;<sup>15</sup> este análisis difiere del presente estudio, en el que se cataloga la estructura de la cromatina, como principal cambio nuclear producido por el VPH.

Murata y colaboradores, aplicaron estudios morfo nucleares mediante análisis de imágenes digitales

para cuantificar la morfología nuclear, incluido el patrón de distribución de la cromatina en la citología de diversos órganos, concluyendo que la morfometría nuclear es, por lo tanto, una herramienta objetiva útil en la diferenciación de los frotis cervicales premalignos y malignos y en casos de dilemas diagnósticos que se encuentran en zonas grises en frotis cervicales, especialmente por ASCUS o AGUS, al combinar los hallazgos del examen clínico, los parámetros morfométricos, citomorfológicos y nucleares, se puede mejorar la precisión diagnóstica del cribado del cáncer cervicouterino y, por lo tanto, ayudar a los médicos a aplicar las modalidades de tratamiento apropiadas.<sup>16</sup> Estos resultados son similares a este estudio donde el patrón cromático es esencial para el diagnóstico de lesión intraepitelial de bajo grado.

Resultados similares, descritos por Guillaud y colaboradores demostraron la hipótesis de que la positividad del VPH se correlaciona con la textura de la cromatina en la célula.<sup>17</sup> Los análisis provisionales son importantes ya que este estudio involucra a 2000 pacientes y genera 6000 muestras de biopsia que se sometieron a análisis histopatológico cuantitativo y se

correlacionaron con positividad para VPH según lo medido por la prueba Hybrid Capture II (Digene; Gaithersberg, MD) y ADN-VPH y ARNm por PCR. La sensibilidad de la clasificación fue del 52-54% y la especificidad fue de 77-78%, para el VPH,<sup>16,18</sup> la tasa de positividad fue de 70% por biopsia y de 73% por paciente. Aunque estos resultados son preliminares, sugieren que las características de la textura que reflejan la condensación de la cromatina pueden correlacionarse con la positividad del VPH,<sup>17</sup> al igual que este estudio, se examinó, y comprobó el cambio de la cromatina con la integración del VPH al genoma celular.

Graterol y colaboradores publicaron un estudio de la ultraestructura del cuello uterino en pacientes con ADN viral positiva para VPH, observando la presencia de figuras mielínicas, gránulos de lipofucsina, cambios en las mitocondrias, células con alargamiento nuclear, núcleos hiper cromáticos, distribución anormal de la cromatina, pleomorfismo nuclear y aumento de la relación núcleo / citoplasma.<sup>18</sup> Los resultados de este estudio son similares a los obtenidos en esta investigación, donde se describen los efectos citopáticos causados por el VPH, en las lesiones intraepiteliales de bajo grado las cuales se caracterizaron por discariosis, dadas por una distribución atípica de la cromatina, observando además membranas nucleares irregulares, al igual que núcleos aumentados de tamaño.

A semejanza del presente estudio, Drobic y colaboradores, comprobaron que los núcleos exhiben cambios en la forma y la reorganización de la cromatina, que parece correlacionarse con la malignidad.<sup>19</sup> La tumorigénesis implica múltiples pasos, es un proceso que resulta de alteraciones en la función del ADN. Estas

alteraciones son el resultado de cambios genéticos estables, incluidos los de genes supresores de tumores, oncogenes y genes de estabilidad del ADN, y cambios epigenéticos potencialmente reversibles, que son modificaciones en la función del gen sin un cambio en la secuencia de ADN. La metilación del ADN y las modificaciones de las histonas son dos mecanismos epigenéticos que se alteran en las células cancerosas.

Se concluye, que es relevante describir la textura de la cromatina nuclear en todo informe citológico, ya que la heterocromatina nuclear se desenrolla para luego acoplarse al genoma del VPH, lo cual es visto por el microscopio óptico como una cromatina laxa. En los informes citológicos, algunos anatomopatólogos y citotecnólogos, no describen la cromatina nuclear, obviando una de las características morfológicas más evidentes en una lesión precancerosa.

Cuando se usa, la citología líquida que es un método de recolección de la muestra más fisiológico, y menos traumático, se están obteniendo células del exocervix con características, más parecidas a una apoptosis, puesto que son células que descaman del epitelio, normalmente mediante la muerte celular programada, reconociendo que una célula precancerosa presenta ruptura de desmosomas, lo cual hace que pierda adherencia y sea más fácil de desprender por la fricción de un cepillito cervical.

En cambio, cuando se realiza la citología convencional las células presentan más deformidad celular por desecación y al practicarse una biopsia, está la desventaja de que la muestra es menos representativa y la célula presentará características de una necrosis.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Organización Mundial de la Salud. Control integral del cáncer cervicouterino. Guía de prácticas esenciales. 2007. ISBN 978 924 354700 8.
- 2) Sánchez M, Vargas R, Muñoz C. Incidencia y mortalidad del cáncer en Costa Rica 1997. San José: Ministerio de Salud, 2002. pp. 27.
- 3) Rodríguez M. Virus Papiloma Humano. Riesgo latente. Salud 2005;4:17-20.
- 4) Human Papillomavirus and Related Cancers. Fact Sheet 2014 ICO HPV Information Centre Disponible en: [http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/VEN\\_FS.pdf](http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/VEN_FS.pdf)
- 5) Ludueña, M. Vacuna contra virus papiloma humano y prevención del cáncer de cuello uterino. Rev. Pediatrics. 2010; 49(1):1-2
- 6) M Duarte, Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. GynecolOncol. 2007; 107(2 Suppl 1):S2-S5.
- 7) Bharadwaj M, Hussain S, Nasare V, Das BC. HPV vaccination: issues in developing countries. Indian J Med Res. 2009; 130 (3):327-33
- 8) Cortiñas P, Ríos K, Sánchez L. Citología cervical como pesquisa: Factores para mejorar la sensibilidad. Gac Méd Caracas. 2017 ;116(1): 37-40.
- 9) Ricci A, Perucca E, Koljamine J, Baeriswyl J. Citología de base líquida: Revisión de la historia y los estudios al respecto. Rev Chil Obstet Ginecol 2004; 69(3):256-262.
- 10) Contreras R. Papanicolaou y citología líquida en diagnóstico de cáncer de cérvix: Hospital Civil de Maracay, 2012. Comunidad y Salud. 2015; 13(1): 12-22.
- 11) Campo P, Puerto, M. Comparación entre las técnicas de citología compartida: convencional vs. Base líquida. Repertorio de Medicina y Cirugía. 2011; 20(4): 240-244.
- 12) Rubio CA, Kranz I. The exfoliating cervical epithelial surface in dysplasia, carcinoma in situ and invasive squamous carcinoma. I. Scanning electron microscopic study. Acta Cytol. 1976; 20(2):144-50.
- 13) Murphy J, Allen J, Jordan J, Williams A. Scanning electron microscopy of normal and abnormal exfoliated cervical squamous cells. Br J Obstet Gynaecol. 1975; 82(1):44-51.
- 14) Kocher O, Amaudruz M, Schindler AM, Gabbiani G. Desmosomes and gap junctions in precarcinomatous and carcinomatous conditions of squamous epithelia. An electron microscopic and morphometrical study. Journal of Submicroscopic Cytology. 1981; 13(2).
- 15) Rani M, Narasimha A, Kumar M. Evaluation of Pre-Malignant and Malignant Lesions in Cervico Vaginal (PAP) Smears by Nuclear Morphometry. J Clin Diagn Res. 2014; 8(11):FC16-C19. doi: 10.7860/JCDR/2014/10367.5221. Epub 2014 Nov 20.
- 16) Murata S, Mochizuki K, Nakazawa T, Kondo T, Nakamura N, Yamashita H, et al. Morphological abstraction of thyroid tumor cell nuclei using morphometry with factor analysis. Microsc Res Tech. 2003;61:457-62.
- 17) Guillaud M, Adler-Storthz K, Malpica A, Staerckel G, Matisic J, Van Niekirk D, Cox D, Poulin N, Follen M, Macaulay C. Subvisual chromatin changes in cervical epithelium measured by texture image analysis and correlated with HPV. Gynecol Oncol. 2005; (3 Suppl 1):S16-23.
- 18) Graterol I, Finol H, Correnti M. Virus del papiloma humano en lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) de cuello uterino. Tipificación y ultra estructura. Rev. Soc.Ven.Microbiol.2006; (96):25-47.
- 19) Drobic B, Dunn KL, Espino PS, Davie JR. Abnormalities of chromatin in tumor cells. EXS. 2006;(96):25-47.