

## VIRUS PAPILOMA HUMANO

### APLICACIÓN Y UTILIDAD CLÍNICA DE LAS PRUEBAS MOLECULARES

La infección por HPV es la enfermedad de transmisión sexual más común entre hombres y mujeres. Se estima que alrededor del 70 % de las mujeres sexualmente activas, pueden adquirir la infección viral a lo largo de su vida.

Existe a la fecha una importante evidencia científica que involucra al Virus Papilloma Humano (HPV) en forma directa con el desarrollo de cáncer cervical. El cáncer de cuello de útero es el segundo en frecuencia en las mujeres entre los 30 y los 50 años de edad. Se han implementado con éxito en los últimos años varios tipos de pruebas moleculares para su detección, tales como PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa), Captura híbrida, Genotipificación e Hibridización *in situ*, las que se han utilizado también para despejar resultados de citologías dudosas, con lesiones precursoras o incluso para el monitoreo de la infección o su autolimitación <sup>(1)(2)(3)</sup>. Recientemente se ha comprobado que la detección de RNA mensajero para oncoproteínas E/6 y E/7, determina la actividad oncogénica de ciertos genotipos asociados a procesos neoplásicos. Los estudios moleculares para HPV han demostrado ser eficaces, seguros, reproducibles y con utilidad clínica, por lo que han sido incorporados a numerosos programas de screening. Sin embargo, no son, por si solos, más que una foto de la infección presente, sin datos prospectivos. **La detección de RNA mensajero de las oncoproteínas E6/E7, surge como una herramienta importante a la hora de adoptar una actitud terapéutica y puede convertirse en un marcador de actividad oncogénica asociado directamente con el desarrollo de cáncer de cuello de útero, que completaría con el pronóstico, el diagnóstico efectuado por las técnicas moleculares utilizadas hasta el momento** <sup>(13-15-14-16-17)</sup>.

Más de 100 genotipos de HPV han sido aislados y caracterizados, de ellos, alrededor de 40 infectan el epitelio del tracto anogenital y aerodigestivo <sup>(4)</sup>. Sobre estudios epidemiológicos se ha podido establecer una clasificación que diferencia genotipos de alto riesgo, de probable alto riesgo y de bajo riesgo, la que es reproducida en la tabla 1 <sup>(5)</sup>. Se considera hoy, que una infección persistente con un genotipo de alto riesgo es el primer escalón en el proceso de carcinogénesis.

La gran mayoría de de las infecciones por HPV son asintomáticas y transitorias, especialmente en mujeres menores de 30 años, y alrededor del 90 % de las nuevas infecciones se resuelven dentro de los dos años <sup>(6)</sup>. No se conoce aún el mecanismo por el cual en algunos individuos, un genotipo de alto riesgo puede autolimitarse y en

otros genera un proceso neoplásico <sup>(7)</sup>. Seguramente juegan un rol importante en este proceso, factores del huésped, virales, coinfecciones con HIV, Chlamydia trachomatis, Herpes simplex, inmunosupresión, HLA, etc.

Según datos publicados, el HPV puede detectarse por presencia de DNA en un 99.7 % de mujeres con confirmación citológica de carcinoma de células del epitelio escamoso, y debido a la alta sensibilidad de la técnica, también en un 13.4 % de mujeres con citología normal <sup>(2)</sup>

GRUPO	GENOTIPOS HPV
ALTO RIESGO ESTABLECIDO	16-18-31-33-35-39-45-51-52-56-58-59
PROBABLE ALTO RIESGO	26-53-66-68-73-82
BAJO RIESGO ESTABLECIDO	6-11-13-40-42-43-44-54-61-70-72-81-CP6108 (89)

**Tabla 1: Clasificación epidemiológica de los tipos de Virus Papilloma Humano**

Muñoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24(Suppl. 3), S1-S10 (2006).

## FISIOPATOGENIA

El HPV es un virus DNA que infecta las células basales y replica en el núcleo de las células del epitelio escamoso. Seguidamente a la infección los genes tempranos del HPV (E6, E7, E1, E2, E3, E4 y E5) comienzan a expresarse y el DNA se replica desde la forma episomal que toma el virus. Luego de esta fase, se expresan los genes tardíos L1 y L2, además de E4. Los viriones pueden iniciar entonces nuevas infecciones a otras células e iniciar otros ciclos. Las lesiones intraepiteliales de bajo grado, favorecen la replicación viral completa y la autolimitación, mientras que la progresión a lesiones intraepiteliales de alto grado y a carcinoma invasivo, están asociadas a una infección persistente con un genotipo de alto riesgo y a la integración del genoma viral al genoma de la célula huésped. Este evento conduciría a la pérdida o interrupción de E2, lo que provocaría una sobreexpresión de las proteínas E6 y E7 <sup>(7-8-9)</sup>. Las proteínas E6 y E7 se consignan como oncogenes del genoma viral y su expresión es necesaria para iniciar una transformación maligna. Además de otros factores, E6 y E7 intervienen en la degradación de p53 como supresor tumoral y del gen RB (Retinoblastoma),

interfiriendo con la regulación apoptótica de la célula <sup>(7-8)</sup>. Se ha observado que la actividad de de tipos virales de bajo riesgo, son menos eficaces que los de alto riesgo para interferir con p53 y RB. De este modo, los genotipos de bajo riesgo son asociados con el desarrollo de proliferaciones benignas, como verrugas genitales y lesiones intraepiteliales de bajo grado, tendientes a la autolimitación. La expresión de las oncoproteínas E6 y E7 se incrementan con la severidad de la lesión.

## **METODOS MOLECULARES DE DETECCION DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO**

La detección de la presencia del HPV se realiza hoy mediante metodologías moleculares sobre el tejido infectado, ya que es un agente que no puede cultivarse.

Las técnicas que se utilizan actualmente son las siguientes:

**FISH (Fluorescence in situ hybridization):** basada en sondas específicas marcadas con cromógenos o fluoróforos, que identifican segmentos complementarios de DNA tanto en biopsias como en hisopados o cepillados cervicales <sup>(10)</sup>. Posibilita La visualización directa de genoma viral sobre células fijadas, sin embargo resulta una técnica muy laboriosa y carece de sensibilidad para ser utilizada como prueba de screening.

**Captura Híbrida:** Es un ensayo de hibridización en microplaca con amplificación de la señal, que está aprobado por la FDA. Utiliza sondas que detectan trece de los genotipos de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y cinco genotipos de bajo riesgo (6, 11, 42, 43 y 44). Posee menor sensibilidad analítica que la PCR y es más costosa que otras metodologías. El ensayo de Captura híbrida no permite identificar específicamente los genotipos presentes en la muestra, debido a lo cual, se hace necesario utilizar otras técnicas para la genotipificación <sup>(10 - 11)</sup>.

**Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):** Es sin duda la técnica con mayor sensibilidad y de elección para procesar aquellas muestras con escasa cantidad de células o de muy baja carga viral. Se realiza con controles internos para evitar tanto los resultados falsos positivos como falsos negativos. Se amplifica una región del DNA altamente conservada (L1), con primers que son de consenso internacional (MY11/MY9) y otros alternativos para evitar la aparición de falsos negativos (GP5/GP6), que aumentan la sensibilidad de la reacción, llevándola al 88%. <sup>(12)</sup> Tiene un alto valor predictivo negativo y un valor predictivo positivo menor debido a que detecta la presencia de infecciones que pueden ser transitorias. Con la misma muestra y a partir del mismo producto de amplificación, puede realizarse la genotipificación tanto por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), como por secuenciación directa de DNA. Ambas metodologías tienen la posibilidad de identificar a la mayoría de los genotipos conocidos. <sup>(12)</sup>

**Detección de RNA:** La detección de RNA mensajero de E6/E7 y la presencia de actividad oncogénica en muestras cervicales, puede ser efectuada mediante NASBA Real Time (Nucleic acid sequence-based amplification) <sup>(13-14)</sup>. El ensayo detecta los transcritos de cinco de los genotipos de alto riesgo más frecuentes (16, 18, 31, 33 y 45). Este método, NASBA Real Time multiplex con molecular beacons, tiene como ventaja, la detección y genotipificación simultánea en un mismo tubo, con lo cual se minimiza el riesgo de contaminación por *carry over*. Pero su aspecto metodológico más interesante radica en la posibilidad de detectar la actividad oncogénica en la misma reacción si el genotipo presente es alguno de los cinco mencionados. Su valor predictivo positivo es alto incluso en mujeres menores de 30 años. Este es un método estandarizado y disponible comercialmente, que cuenta con la aprobación de la Comunidad Europea.

La principal ventaja de este tipo de detección es el valor clínico predictivo, que adquiere una importante dimensión cuando se trata de pacientes con lesiones intraepiteliales. <sup>(15-14-16-17)</sup>

La detección de RNA mensajero puede ser efectuada también por técnicas *home made* como la RT-PCR

## **APLICACIÓN CLÍNICA DE LAS DIFERENTES PRUEBAS MOLECULARES:**

La utilidad clínica de la detección de HPV se observa en las siguientes situaciones:

- Rastreo primario en mujeres mayores de 30 años
- Mujeres con lesiones citológicas menores o indefinidas
- Monitoreo en mujeres tratadas por lesiones de alto grado, para detectar infección persistente o recurrente <sup>(18)</sup>

Se han efectuado diferentes ensayos en los que se observa que la detección de presencia viral es importante para mejorar los programas de rastreo de HPV; sin embargo, la detección de DNA de HPV es muy sensible pero menos específica que la citología, convirtiendo en bajo, el valor predictivo positivo. No se discute la importancia del valor predictivo negativo.

La detección (tanto por PCR como por Captura Híbrida), es una importante herramienta a la hora de evaluar mujeres con resultado citológicos dudosos (ASCUS),

**bionet**

**biología molecular aplicada**

de hecho, en USA, la FDA aprueba la Captura híbrida como metodología de detección primaria en mujeres mayores de 30 años a partir del año 2003 y en Europa, si bien se discute aún la utilización del DNA en las pruebas de screening, se recomienda para el seguimiento en la vigilancia de mujeres con ASCUS y en el monitoreo posterior al tratamiento de lesiones preneoplásicas <sup>(18-19)</sup> Trabajos efectuados en varios países europeos, revelan que las detecciones de DNA efectuadas en mujeres mayores de 30 años, reducen la incidencia del CIN2 y muestran la diferencia de evolución de aquellas pacientes con CIN2 con genotipos de alto riesgo. <sup>(20-21-22)</sup>.

En cuanto a los nuevos marcadores moleculares de actividad oncogénica, tales como el RNA mensajero de oncoproteínas E6/E7, es compartido el concepto sobre su clara necesidad para establecer la evolución hacia el cáncer de cuello de útero. Así como se dijo, que las pruebas moleculares como Captura Híbrida o PCR son una foto de la paciente en el momento de la toma de la muestra, éstos datos junto al valor pronóstico de los ensayos de RNA mensajero, constituyen un valioso aporte para la adecuada interpretación de la evolución de la paciente con posibilidades de desarrollar un cáncer de cervix. <sup>(23-24-25-26-15)</sup>

En síntesis:

El HPV es necesario aunque no suficiente para generar el cáncer de cuello.

Para ello, debe ocurrir:

- La alteración en el ciclo de vida del virus.
- La infección persistente con HPV de alto riesgo.
- La integración al DNA del huésped, la pérdida de E2 y la consiguiente sobreexpresión de E6 y E7.

Los tipos virales de alto riesgo son detectados en el 99 % de los carcinomas cervicales por técnicas moleculares

Los estudios de DNA para HPV son de utilidad clínica en los siguientes casos:

- Como screening en mujeres mayores de 30 años
- Como monitoreo en pacientes con lesiones menores o citología dudosa
- Como monitoreo posterior al tratamiento en infecciones persistentes o recurrentes
- Para la evaluación de riesgo en las lesiones de alto grado, es importante la genotipificación de HPV.

**bionet**

**biología molecular aplicada**

Diagonal 73 nº 1374 - 1900 la plata - argentina - Tel/fax 54 221 4820441 / 4223878  
info@bio-net.com.ar www.bio-net.com.ar

Los test de DNA poseen alta sensibilidad con alto valor predictivo negativo y bajo valor predictivo positivo.

Al momento de evaluar el pronóstico de riesgo de desarrollar un carcinoma de cuello de útero, se considera como marcador de elección el ensayo de detección de RNA mensajero para oncoproteínas E6 y E7, debido a su correlato clínico y a su alto valor predictivo positivo.

**BIONET**

**AREA DE DIFUSION**

### *Referencias*

- 1) Parkin DM, Bray F. Chapter 2: the burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 24(Suppl. 3), S11-S25 (2006).
- 2) Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24(Suppl. 3), S1-S10 (2006).
- 3) Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189,12-19 (1999).
- 4) Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: human papillomavirus and cervical cancer - burden and assessment of causality. *J. Natl Cancer Inst. Monogr.* 31, 3-13 (2003).
- 5) Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 348(6), 518-527 (2003).
- 6) Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 24(Suppl. 3), S42-S51 (2006).
- 7) Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat. Rev. Cancer* 7(1), 11-22 (2007).
- 8) Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2(5), 342-350 (2002).
- 9) Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin. Sci. (Lond.)* 110(5), 525-541 (2006).
- 10) Evans MF, Cooper K. Human papillomavirus integration: detection by in situ hybridization and potential clinical application. *J. Pathol.* 202(1), 1-4 (2004).

**bionet**

**biología molecular aplicada**

Diagonal 73 nº 1374 - 1900 la plata - argentina - Tel/fax 54 221 4820441 / 4223878  
info@bio-net.com.ar www.bio-net.com.ar

- 11) Qureshi MN, Rudelli RD, Tubbs RR, Biscotti CV, Layfield LJ. Role of HPV DNA testing in predicting cervical intraepithelial lesions: comparison of HC HPV and ISH HPV. *Diagn. Cytopathol.* 29(3), 149-155 (2003).
- 12) Meijer CJ, Snijders PJ, Castle PE. Clinical utility of HPV genotyping. *Gynecol. Oncol.* 103(1), 12-17 (2006)..
- 13) Smits HL, van-Gemen B, Schukink R *et al.* Application of the NASBA nucleic acid amplification method for the detection of human papillomavirus type 16 E6-E7 transcripts. *J. Virol. Methods* 54(1), 75-81 (1995).
- 14) Sotlar K, Stubner A, Diemer D *et al.* Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* 74(1), 107-116 (2004).
- 15) Lie AK, Risberg B, Borge B *et al.* DNA-versus RNA-based methods for human papillomavirus detection in cervical neoplasia. *Gynecol. Oncol.* 97(3), 908-915 (2005).
- 16) Castle PE, Dockter J, Giachetti C *et al.* A cross-sectional study of a prototype carcinogenic human papillomavirus E6/E7 messenger RNA assay for detection of cervical precancer and cancer. *Clin. Cancer Res.* 13(9), 2599-2605 (2007).
- 17) Wang-Johanning F, Lu DW, Wang Y, Johnson MR, Johanning GL. Quantitation of human papillomavirus 16 E6 and E7 DNA and RNA in residual material from ThinPrep Papanicolaou tests using real-time polymerase chain reaction analysis. *Cancer* 94(8), 2199-2210 (2002).
- 18) Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJ, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J. Chapter 9: clinical applications of HPV testing: a summary of meta-analyses. *Vaccine* 24(Suppl. 3), S78-S89 (2006)..
- 19) Koliopoulos G, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Kyrgiou M, Prendiville W, Paraskeva E. Diagnostic accuracy of human papillomavirus testing in primary cervical screening: a systematic review and meta-analysis of non-randomized studies. *Gynecol. Oncol.* 104(1), 232-246 (2007).
- 20) Davies P, Arbyn M, Dillner J *et al.* A report on the current status of European research on the use of human papillomavirus testing for primary cervical cancer screening. *Int. J. Cancer* 118(4), 791-796 (2006).
- 21) Naucler P, Ryd W, Tornberg S *et al.* Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 357(16), 1589-1597 (2007).
- 22) Naucler P, Ryd W, Tornberg S *et al.* HPV type-specific risks of high-grade CIN during 4 years of follow-up: a population-based prospective study. *Br. J. Cancer* 97(1), 129-132 (2007).

23)Ratman S, Coutlee F, Bentley J *et al.* HPV E6/E7 mRNA testing in cervical cancer screening: preliminary results from a multicenter Canadian study. Presented at: *24th International Papillomavirus Conference*. Beijing, China, November 3-9 (2007) (Abstract).

24)Trope A, Sjoborg KD, Eriksen T *et al.* Comparison of HPV DNA- and RNA-testing in women with cervical neoplasia. Presented at: *24th International Papillomavirus Conference*. Beijing, China, November 3-9 (2007) (Abstract).

25)Molden T, Kraus I, Skomedal H, Nordstrom T, Karlsen F. PreTect HPV-Proofer: real-time detection and typing of E6/E7 mRNA from carcinogenic human papillomaviruses. *J. Virol. Methods* 142(1-2), 204-212 (2007).

26)Cuschieri KS, Whitley MJ, Cubie HA. Human papillomavirus type specific DNA and RNA persistence - implications for cervical disease progression and monitoring. *J. Med. Virol.* 73(1), 65-70 (2004).