

Pruebas moleculares para la detección del virus papiloma humano. Desafíos y posibilidades.

María Eugenia Cavazza, María Correnti.

Instituto de Biomedicina. Instituto de Oncología y Hematología. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Instituto de Investigaciones Raúl Vincentelli. Facultad de Odontología. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

Resumen

El uso de sondas moleculares, basadas en la secuencia de los ácidos nucleicos de los organismos, es una de las herramientas más sensibles y específicas disponibles actualmente y por ello se ha empleado extensivamente en la detección, genotipaje y evaluación de la carga viral de VPH. Estas metodologías moleculares pueden emplearse en muestras biológicas de distintas entidades: piel, mucosas, semen, moco cervical y orina. La incorporación de las pruebas de VPH como análisis de rutina en la práctica clínica permitirá un mejor diagnóstico y seguimiento de los procesos malignos asociados a este virus, principalmente en los países en vías de desarrollo.

Palabras Clave: Papiloma virus, cáncer, biología molecular.

Molecular test for detection of human papiloma virus. Challenges and possibilities.

Abstract

The use of molecular probes, based in the nucleic acid sequences of the organisms, is the most sensible and specific assay available at the moment. These tests have been used extensively in the detection, genotype and evaluation of the viral load of HPV. These molecular methodologies can be used in different biological samples: skin, mucous, semen, cervical biopsy and urine. The incorporation of molecular HPV tests as clinical routine assay will allow to a better diagnosis and follow up of the malignant processes associated this virus, especially in the developing countries.

Key words: Papillomavirus, cancer, molecular biology.

Introducción

Los papillomavirus tienen un tamaño de 50 nm, una estructura icosaédrica compuesta por 72 capsómeros formados mayoritariamente por la proteína L1 y un genoma de ácido desoxirribonucleico (ADN). Aunque su estructura es similar a la de los poliomavirus, han sido erróneamente clasificados dentro de la familia Papovaviridae. Ambos géneros son funcionalmente distintos y por ello se han dividido en dos familias diferentes.

Existen muchas divisiones dentro del género papillomavirus, con diferentes animales especie-específica como hospedadores para varios subgrupos. El virus de papiloma humano (VPH) comprende un gran subgrupo con más de 100 tipos denominados tipos clasificados por homología genómica¹, algunos de los cuales tienen potencial carcinogénico y otros causan usualmente lesiones

epiteliales no malignas. Estos virus son difíciles de cultivar rutinariamente en el laboratorio. Las pruebas serológicas experimentales no han demostrado ser lo suficientemente sensibles y específicas como sistemas de detección ó clínico².

La mayoría de los estudios básicos y clínicos han empleado uno o más de las tres pruebas basadas en la homología de los ácidos nucleicos, permitiendo tanto la detección como el establecimiento del genotipo particular de VPH. Estos tres análisis son: hibridación *in situ* (HIS), reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y el sistema del híbrido de captura (SHC).

El empleo de sondas moleculares, basadas en la secuencia de los ácidos nucleicos de los organismos, es una de las herramientas más sensibles y específicas disponibles actualmente y por ello se ha empleado extensivamente en la detección, genotipaje y evaluación de la carga viral de VPH.

En Venezuela el cáncer de cuello uterino es un problema de salud pública. En nuestra población femenina, es la localización más frecuente con una incidencia del 25,54%, seguida de cáncer de mama (16,42%) y cáncer de colon y recto (7,03%).

Cada año se detectan 3.000 casos nuevos de cáncer de cuello uterino en mujeres en edades comprendidas entre 25 y 64 años. La afección además de ser la más frecuente, es la primera causa de muerte oncológica en las mujeres venezolanas.

Estudios epidemiológicos realizados en países desarrollados y en vías de desarrollo presentan indicios que los virus genotipo específico de VPH están asociados a la patogénesis de lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) y al cáncer invasor cervicouterino. Igualmente se ha demostrado que la progresión de LIE a cáncer invasivo suele estar asociada a la infección viral persistente por VPH.

Algunas de las pacientes infectadas por VPH no desarrollan cáncer cervical aún cuando se encuentran infectadas por uno o más tipos oncogénicos; sugiriendo que se requieren eventos adicionales para la transformación neoplásica. Se ha propuesto que uno de los factores importantes que propician la progresión es la persistencia de la infección y la habilidad que posee el virus de expresar determinados genes por tiempo prolongado, independientemente de que la infección tenga manifestaciones clínicas o subclínicas.

El método convencional para la pesquisa de cáncer cervicouterino ha sido la citología cérvico-vaginal y su interpretación se basa en la clasificación de Papanicolaou. Una evaluación anual de manera óptima permitiría prevenir hasta un 70% de las neoplasias cervicales. Sin embargo, el método tiene limitaciones importantes entre las cuales se encuentra el impedimento de una automatización completa de la técnica, variaciones constantes para mejorar su sensibilidad y la sobre valoración de los hallazgos citológicos, sobre todo en las evaluaciones de los cambios morfológicos, aunado a que la citología únicamente permite sugerir la presencia de una infección por VPH pero hasta ahora no es posible hacer la detección certera del virus, indicar si hay infección mixta viral y los genotipos correspondientes.

Lo anterior ha conllevado a:

1. Diagnóstico de cambios atípicos ambiguos que no pueden ser confirmados;
2. Tratamientos excesivos por Papanicolaou dudosos y
3. Manejo inadecuado de pacientes con lesiones cervicales cuyo Papanicolaou fue negativo.

La clasificación de Papanicolaou no comunica de manera totalmente confiable la información de relevancia clínica, además que no se corresponde con los puntos de vista actuales de las lesiones preinvasoras, la distribución de VPH y las pautas vigentes del manejo clínico. Lo anterior condujo a

una nueva clasificación citológica: el Sistema Bethesda, que viene a sustituir la clasificación de Papanicolaou. Esta clasificación incluye dos subgrupos designados como lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIEbg) y lesiones intraepiteliales de alto grado (LIEag) para clasificar las lesiones escamosas preinvasoras.

En base a los estudios clínico-patológicos y moleculares se conoce que la infección viral pasa por un *continuum* morfológico: LIEbg (VPH y/o NIC I) o infección activa producida por algunos de los tipos de VPH frecuentemente asociados al tracto genital femenino y LIEag (NIC II - NIC III) que está asociado a genotipos restringidos de VPH, usualmente VPH 16 y VPH 18. Usualmente, las LIEbg hacen regresión, mientras que la mayoría de los LIEag progresan a neoplasia cervical. Por lo tanto, el sistema de Bethesda aunado a las técnicas de biología molecular permite un mejor análisis de los aspectos morfológicos de las lesiones preinvasoras y los conocimientos actuales de la infección por VPH, le permite al clínico sospechar el potencial oncogénico de los mismos. La utilización de las técnicas de biología molecular contribuye a detectar la presencia del genoma viral en material de citología y biopsias aun si la infección es oculta o el número de partículas virales es bajo.

Tipos de pruebas moleculares basadas en sondas de ácidos nucleicos.

Las pruebas basadas en sondas pueden dividirse en tres grandes grupos:

1. Pruebas sin amplificación.
2. Pruebas con la secuencia diana amplificada.
3. Pruebas con señales químicas de visualización amplificada.

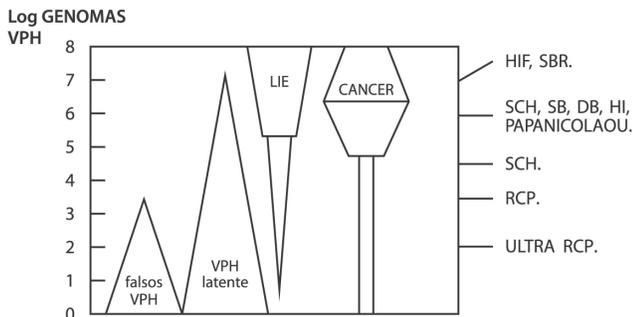
En la Tabla 1 se señalan las pruebas moleculares más importantes:

Tabla 1. Pruebas moleculares para la detección de secuencias de ADN y/o ARN.

Categoría Molecular	Pruebas
Amplificación de la secuencia	Reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Reacción en cadena de la Ligasa (RCL). Amplificación de la secuencia de ácido nucleico (NASBA).
Amplificación de la señal	Sistema del Híbrido de captura (SHC). ADN Ramificado (ADNb).
Sin amplificación	Southern Blot (SB)*. Dot blot (DT)*. Hibridación <i>in situ</i> sobre filtro (HISF). Hibridación <i>in situ</i> en muestras biológicas (HIS). Southern Blot reverso (SBR)*. Northern Blot (NB)*.

(*): Se ha colocado el nombre en inglés para un mejor entendimiento en el texto.

En la Figura 1 se muestra la sensibilidad relativa de las distintas pruebas empleadas para la detección del ADN de VPH en los últimos 10 años.



Tomado de Obstetrics and Gynecology Clinics of North America, 1996³.

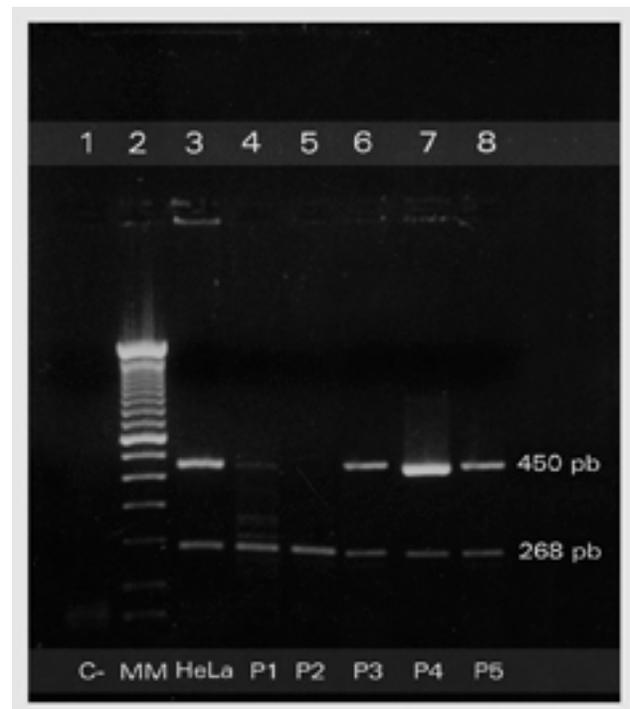
La técnica de ISH únicamente detecta VPH en células y presenta la misma sensibilidad del Papanicolaou. Algunas infecciones latentes de VPH se pueden detectar con métodos menos sensibles.

El eje de las Y representa el total del número de genomas en una muestra de aproximadamente 500.000 células. Está demostrado que en una muestra citológica puede haber entre 50.000 a 5 millones de células. Este fenómeno produce una gran variación entre los diferentes métodos de diagnóstico e introduce una variabilidad impredecible. La forma del gráfico en cada una de las entidades sugiere la distribución de los niveles de VPH en las categorías. Por ejemplo, el ensanchamiento de la forma correspondiente al grupo LIE representa el hecho que muchos LIEs tienen una alta carga viral de VPH y por lo tanto puede ser detectada en forma confiable por FISH y SBR; los que tienen baja carga viral pueden ser analizados únicamente por técnicas muy sensibles. La infección latente de VPH es 10 veces más común y detectable por RCP que el diagnóstico de LIE, pero este rango varía en la medida que las pruebas son más sensibles. En general, en la población femenina joven, el 50% de las muestras analizadas por RCP¹ presentan infección latente de VPH pero la prevalencia declina con la edad. Las muestras diagnosticadas como cáncer y carcinoma *in situ* tienen menor número de copias de ADN-VPH que los LIEs, y alrededor del 5% de las muestras son negativas aun por RCP ultrasensible, el cual es capaz de detectar hasta 10 copias de ADN-VPH.

Los falsos VPH son el resultado de fallas metodológicas y contaminación en el procesamiento de las muestras, particularmente cuando se emplean técnicas de alta sensibilidad como el RCP ultra cuantitativa y RCP simple; de aquí la importancia de estructurar laboratorios de biología molecular con las pautas correctas para la infraestructura y funcionamiento. En la Figura 2 se observa la detección por RCP de muestras clínicas empleando los iniciadores

universales de la región L1 y L2 viral, los cuales permiten detectar la presencia de VPH mas no su genotipo. El genotipo puede ser realizado posteriormente por una nueva RCP con iniciadores específicos para los genotipos más importantes como el VPH 16, 18, 6, 11, 31 y 33 o mediante el uso de enzimas de restricción analizando los fragmentos de digestión cuyo patrón es característico para cada genotipo de VPH.

Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Laboratorio de Genética Molecular. Instituto de Oncología y Hematología. MSDS.



Carril 1:	C- = Control negativo.
Carril 2:	MM = Marcador de peso molecular, (Lambda leader 100 pb).
Carril 3:	HeLa = ADN del control positivo para VPH.
Carriles 4, 6, 7 y 8:	P1, P3, P4, P5 = Pacientes positivos para VPH.
Carril 5:	P2 = Paciente negativo.
Banda de 450 pb:	Presencia de genoma viral.
Banda de 268 pb:	Amplificación del gen de la beta globina. Su presencia indica que el material genético es adecuado para las pruebas.

Valoración con ácido nucleico de señal amplificada

La única prueba del VPH disponible comercialmente y aprobada por la Federal Drug Administration (FDA-USA). La valoración del Híbrido de captura II (HC II) de la empresa Digene Corporation (Bethesda-USA), recurre a la amplificación de señales para detectar el ADN del VPH. Proporciona

una sensibilidad cercana a la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). La HC II detecta 13 tipos de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y 5 tipos de VPH de bajo riesgo oncogénico, está estandarizada y es sumamente reproducible. La prueba HC II consiste en un proceso de laboratorio que produce señales de luz aproximadamente proporcionales a la cantidad de ADN del VPH presente en la muestra (Figura 3)⁴. El proceso exige equipo, que comprende desde suministros básicos de laboratorio hasta instrumental tecnológicamente avanzado, como una computadora conectada a un luminómetro para la lectura de las placas.

El híbrido de captura II permite además un análisis semicuantitativo de las copias de ADN viral, el cual representa un parámetro muy importante en el momento del tratamiento, seguimiento de las pacientes y la evaluación de las posibles vacunas contra la infección por VPH de alto y bajo riesgo oncogénico.

Estas condiciones actualmente limitan el uso de HC II a laboratorios especializados y con personal entrenado. En nuestro país existen cuatro laboratorios que cuentan con la capacidad tecnológica para realizar esta prueba.

El híbrido de captura II sin embargo no es una metodología adecuada para el estudio de la infección por VPH bucofaríngeo ya que existen asociaciones con genotipo de VPH como el 13 y el 32, que no son detectables mediante el formato actual del sistema ya que no incluye las sondas específicas para estos tipos virales.

Autorecolección de muestras

Los estudios indican que las mujeres son capaces de auto-recolectar muestras vaginales para la detección del ADN del VPH. El auto-muestreo puede ser mayor si se aumenta la eficacia del programa a través de una cobertura más extensa de la población. Según estudios para evaluar la prueba HC II, la especificidad de las muestras auto-recolectadas era más baja, pero la sensibilidad era comparable a la de la prueba citológica convencional para detectar las LIEag en mujeres de 35 años o mayores⁶. Las muestras auto-recolectadas por las mujeres y examinadas arrojaron resultados de sensibilidad satisfactoria, dato suficiente para justificar una evaluación más universal^{5,6}. El impacto

de las muestras auto-recolectadas para la eficacia del programa, en cambio, todavía no ha sido evaluado.

Características de las pruebas

Los métodos de detectar el ADN de VPH, HCII y RCP requieren el transporte de la muestra (y uso de un medio de transporte) al laboratorio, almacenamiento, y tiempo de procesamiento en el laboratorio. Estas características de las pruebas tendrán implicaciones programáticas. La prueba del VPH es objetiva con resultados rápidos y en corto tiempo. Sin embargo, el control de la calidad para el uso de pruebas de VPH precisa de más evaluación.

Desempeño de las pruebas

Las investigaciones indican que las pruebas del ADN del VPH podrían llegar a convertirse en un método de «tamizaje» primario en mujeres a partir de los 30 años. En estas mujeres, la sensibilidad de una única valoración HC II en su vida para detectar la displasia de alto grado ha sido cercana al 80-90% (más elevada que la de la prueba citológica) y la especificidad ha oscilado entre 57 a 89%⁷⁻⁹. Además, la HC II puede ser más eficaz que la prueba citológica convencional o la inspección visual con ácido acético para el «tamizaje» de las mujeres posmenopáusicas. Sin embargo, cuando se usa para detectar las LIEag, la especificidad de la prueba es solamente moderada, en el mejor de los casos, en particular en las menores de 30 años. La prueba tiene un valor predictivo negativo alto.

Microordenadores de ADN

La aplicación de la metodología de ADN-microordenadores (en inglés microarrays) permitirá estudiar la regulación y la expresión de los genes virales en los diferentes estadios de la infección viral y su relación con la expresión de proteínas celulares de los diferentes tejidos en los cuales este virus es capaz de replicarse. En otros aspectos se podrán definir con mejor precisión los virus mutantes, el proceso de diferenciación en líneas celulares en cultivo y la respuesta del hospedador.

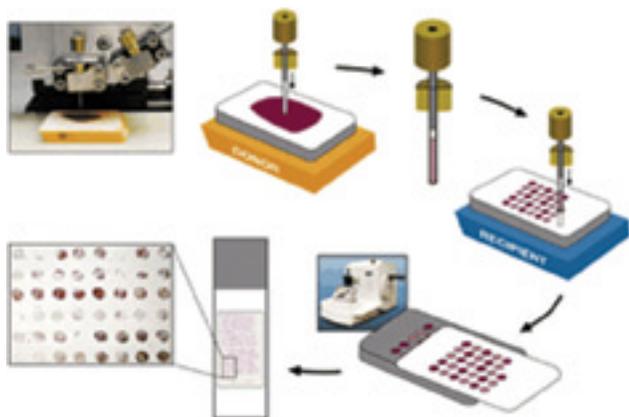
Actualmente se está empleando la metodología de microordenadores en el estudio de la infección por VPH para identificar marcadores celulares de progresión en pacientes

Fig. 3. Prueba de captura híbrida II (HC II).



infectados. Otro desarrollo consiste en microordenadores de tejidos en donde se relocaliza el tejido a partir de los bloques histológicos de parafina y se puede visualizar los resultados de múltiples pacientes ó bloques sobre una misma lámina (Figura 4).

Fig. 4. El microordenador es ensamblado con muestras tomadas con aguja fina de biopsia y colocadas sobre la placa sílica gel . Luego se emplean sondas específicas marcadas con sustancias fluorescentes que permiten su posterior análisis¹⁰.



Conclusión

La incorporación de las pruebas de VPH como análisis de rutina en la práctica clínica es un aspecto importante para el manejo de los procesos malignos asociados a este virus, tanto en países desarrollados como los países en vías de desarrollo. La automatización completa hará que estas pruebas sean empleadas en estudios masivos de población tanto femenina como masculina, disminuirá los costos y evitará realizar repetidas pruebas de Papanicolaou debido a su falta de sensibilidad y la subjetividad del operador. Las pruebas de biología molecular para la genotipificación de VPH vienen a reforzar el diagnóstico también de otras enfermedades de transmisión sexual como la causada por el VIH, *Chlamydia trachomatis*, la gonorrea y la hepatitis B.

Referencias

1. Coggin JR, zur Hausen H: Workshop on Papillomaviruses and cancer. Cancer Research 1979;39:545-552.
2. Wideroff L, Schiffman MH, Nonnenmacher B. Evaluation of seroreactivity to human papillomavirus type 16 virus -like particles in an incident case- control study of cervical neoplasia. J Infect Dis 1995;172:1425-1430.
3. Lorincz A and Reid R. Obstetrics and Gynecology clinics of North America .W B Saunders Company 1996;Vol23,No.3:712.
4. DIGENE CORPORATION. <http://www.digene.com> (2005).
5. Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, et al. HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high-risk province of Costa Rica. Journal of the American Medical Association January 2000;283(1):87-93.
6. Wright T Jr, Denny L, Kuhn L, et al. HPV DNA testing of self-collected vaginal samples compared with cytological screening to detect cervical cancer. Journal of the American Medical Association January 2000;283(1):81-86.
7. Sellors J, Lorincz A, Mahony J, et al. Comparison of self-collected vaginal, vulvar and urine samples with physician-collected cervical samples for human papillomavirus testing to detect high grade squamous intraepithelial lesions. Canadian Medical Association Journal September 2000;163(5):513-518.
8. Dzuba IG, Diaz EY, Allen B, et al. The acceptability of self-collected samples for HPV testing vs. the Pap test as alternatives in cervical cancer screening. Journal of Women's Health and Gender-based Medicine 2002;11:265-275.
9. Cuzick J, Sasieni P, Davies P, et al. A systematic review of the role of human papilloma virus (HPV) testing within a cervical screening programme: summary and conclusions. British Journal of Cancer September 2000;83(5):561-565.
10. <http://www.tissuearray.org> (2005).