

Comunicación Científica

Utilidad de las técnicas moleculares de detección de VPH
en el control y prevención del cáncer cervicouterinoDra. Rosalba Gutiérrez Rojo¹

Licenciada en Biología, con maestría y Doctorado en ciencias biológicas en la:
Universidad Complutense, Madrid, España. Profesor Investigador titular B de CONACYT,
Actualmente: Director General de Ik'el Diagnóstico Molecular¹
Unidad Médica Prados Providencia
Av. Manuel Acuña 2942 int. 11
Guadalajara Jalisco
Tel (33) 33 53 24 60

diagnosticos@ikel.com.mx gutierrez_rosalba@hotmail.com www.ikel.com.mx

RESUMEN

La infección persistente con tipos oncogénicos del virus de papiloma humano (VPH) ha sido demostrada como un factor necesario para el desarrollo y progresión de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y del cáncer invasor. Considerando dicha asociación, se ha propuesto la incorporación de pruebas de detección viral altamente sensibles y específicas en los programas de tamizaje, como son las técnicas de detección de DNA. Actualmente, se encuentran disponibles una gran variedad de pruebas basadas en la detección de DNA y RNA viral, sin embargo, los dos métodos más utilizados en la detección de VPH carcinogénico son la hibridación con amplificación de señal (CH2) y la amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando un par de oligonucleótidos de amplio espectro, seguida de una hibridación con sondas específicas para tipificación de VPH. Los protocolos que emplean PCR se caracterizan por ser más sensibles y específicos y permiten la detección de infecciones latente sub-clínica y activa por VPH, así como determinar el o los genotipos específicos de VPH que causan dicha infección. La principal utilidad de las pruebas de detección de VPH, es que pueden conducirnos a una detección temprana de lesiones de alto riesgo NIC II/III y recurrencia post-tratamiento, no identificadas por citología; permiten especiar los intervalos del tamizaje para las mujeres que no presenten infección por VPH de alto riesgo y finalmente, invertir mejor los recursos para el seguimiento de las pacientes que conforman los grupos de riesgo.

ABSTRACT

Persistent infection with high-risk human papilloma-viruses (HPV) has been demonstrated as the necessary causal factor for developing high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and potential progression to cervical cancer. Considering this association it has been proposed the incorporation of highly sensitive and specific HPV detection methods such as DNA HPV test for screening programs. Recently, a great variety of DNA and RNA HPV tests are available, nevertheless, the two major methods for detection of carcinogenic HPV DNA are, hybridization with signal amplification (CH2), and genomic amplification using polymerase chain reaction (PCR); they typically have used a pool of primers for broad-spectrum amplification of HPV DNA followed by specific detection of target HPV types using type-specific hybridization probes. PCR-based protocols are highly specific and sensitive and allow the detection of latent and active HPV infection, as well as detection and typing of the specific HPV that causes such infections. The main advantage of these tests is the early detection of high risk lesions NIC II/III and post treatment recurrence this non identified by cytology; can allow lengthen screening intervals in women with negative HPV high-risk test, at the same time, allows more resource investments in the follow up and testing of high risk groups. Palabras clave: PCR, Captura de Híbridos, cáncer cervicouterino, VPH, LEIAG, NIC

A principios de la década de los 80, el desarrollo de tecnologías del ADN para la identificación del VPH en células exfoliadas del cérvix, propicio un gran auge en todo lo referente al pronóstico, diagnóstico, tratamiento y combate contra el cáncer cervicouterino, ya que gracias a éstos métodos los estudios epidemiológicos pudieron confirmar que la mayoría de las asociaciones de riesgo observadas, se deben en gran medida a la persistencia del ADN del virus de papiloma humano. Este hallazgo ha tenido una importancia crucial, debido a que se ha demostrado que es necesaria la presencia de los genotipos de VPH de alto riesgo para el desarrollo de todos los casos de cáncer cervicouterino diagnosticados en el mundo^{1,2,3}.

Por tanto, La clave para una acertada evaluación de riesgo a desarrollar cáncer cervicouterino es la información precisa sobre el virus de papiloma humano. Dada la importancia de la infección por VPH como factor etiológico de éste cáncer, la detección de VPH juega un papel determinante en la práctica clínica de las pacientes con lesiones pre-invasivas o hasta como complemento de la citología. La detección del VPH está reconocida como instrumento útil para la disminución de la incidencia y mortalidad del cáncer de cuello uterino.

En la actualidad, la tendencia de numerosos grupos de investigación es evaluar la posibilidad de emplear distintas técnicas moleculares para la detección del VPH como herramienta en el tamizaje primario del cáncer cervical y la atención de las pacientes con diagnóstico de ASC-US y lesiones de bajo grado^{4,5,6,7,8,9}. Pese a ello, es importante que las técnicas aplicadas tengan una gran sensibilidad y especificidad, además de una buena reproducibilidad y valor predictivos negativo, para considerarlas y aplicarlas de la manera óptima para la detección de VPH en la práctica clínica.

Las pruebas de diagnóstico sistemático de la infección por el VPH pueden ser clasificadas en visuales (colposcopia), microscópicas (citología) y moleculares (PCR, hibridación, secuenciación, etc.). La colposcopia es un procedimiento exploratorio instrumentado para observar la condición del epitelio, que se basan en la identificación anormal de tejido por un emblanquecimiento al aplicar ácido acético¹⁰.

La citología exfoliativa, introducida por George Papanicolaou en 1943, ha sido el pilar en la prevención del cáncer cervical por más de 50 años. El examen de Papanicolaou es sencillo de procesar, de bajo costo, exento de riesgo y puede ser aplicado a un gran número de mujeres¹¹; sin embargo, varios autores coinciden en que el valor de la citología, en el

diagnóstico de la infección por VPH es inferior a lo que se cree¹². La citología cervical no es una técnica diagnóstica, las evidencias científicas coinciden en que posee una sensibilidad y especificidad limitada 50-60% en la detección de lesión NIC II/III, debido a que únicamente reporta si hay algún cambio citopatológico en las células, pero no confirma si la anomalía citológica es provocada por la presencia de algún genotipo de VPH. Por tanto, aunque una sola prueba negativa de Papanicolaou de alta calidad indique un riesgo bajo de cáncer, por lo general es importante repetir la prueba para poder detectar las lesiones NIC II/III^{12,13}.

Hasta la fecha las técnicas basadas en la detección del ADN del VPH son las más precisas, sensibles y específicas en la detección de lesiones pre-malignas y han demostrado su utilidad en la disminución tanto de la mortalidad como de la morbilidad por cáncer cervicouterino. Antes de la era de la tecnología actual de la PCR, los métodos moleculares de elección para la identificación del VPH en tejido crudo o fracciones de ADN fueron: el southern blot, el dot blot y la hibridación *in situ*, aunque la sensibilidad entre estos métodos era muy variable. Hoy en día existen muchos protocolos descritos en publicaciones científicas algunos de ellos validados, que se utilizan en los laboratorios de todo el mundo para la detección del VPH; la gran mayoría se basan en la detección del DNA de los VPH. Recientemente, se han desarrollado protocolos para la detección de RNA mensajero de E6/E7 y proteínas (biomarcadores de transformación); aunque de éstos últimos, se dispone de escasa información acerca de su sensibilidad, especificidad y reproducibilidad (TABLA 1)¹⁴. Indiscutiblemente, los métodos más utilizados en la detección de lesiones de alto riesgo y cáncer cervicouterino son la captura de híbridos de segunda generación CH2, que está disponible como método estandarizado y aprobado por la Food and Drug Administration de Estados Unidos. Y los protocolos que emplean la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de una hibridación para tipificación de VPH y que están disponibles como métodos validados por la Unión Europea CEMark.

CH2

La captura híbrida de segunda generación (del inglés: Hybrid-Capture Second Generation o HC2), se basa en la hibridación utilizando sondas de RNA, complementarias a una secuencia que es común a 13 de los VPH considerados de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68), la captura y detección del híbrido DNA del VPH- RNA de la sonda, se realiza con un anticuerpo conjugado con la enzima

TABLA 1.- Pruebas para la detección del VPH

Marcador	Nombre	Proveedor	Molécula Blanco	Aprobaciones	Genotipos detectados	Tipificación de VPH	Tecnología
DNA VPH	Amplicor	Roche	L1	CE	13 oncogénicos	NO	PCR
	Care HPV	QIAGEN	Genoma completo	CE	13 oncogénicos y VPH 88	NO	Hibridación
	CPE+5/E+EIA	No comercial	L1	N/D	13 oncogénicos y VPH 66	NO	PCR
	HC2	QIAGEN	Genoma completo	FDA/CE/sFDA	13 oncogénicos *****	NO	Hibridación
	HR-HPV DxPCR	BioRad	N/L	N/D	13 oncogénicos y VPH 66	NO	PCR
	Cervista	Hologic	L1	FDA/CE	13 oncogénicos y VPH 66 22 no-oncogénicos	Parcial VPH 16 y 18	Hibridación
	COBAS 4800	Roche	L1	CE	13 oncogénicos y VPH 66	Parcial VPH 16 y 18	PCR TR
	eIC	QIAGEN	Genoma completo	N/D	13 oncogénicos y VPH 66 y 62	Parcial VPH 13,18 y 45	Hibridación
	HPV QUAD	Autogenomics	E1	CE	13 oncogénicos y VPH 66	Parcial VPH 16,18, 31 33 y 45	PCR
	RT HPV	Abbot	L1	CE	13 oncogénicos y VPH 66	Parcial VPH 16 y 18	PCR RT
	N/D	Becton Dickinson	N/D	N/D	13 oncogénicos y VPH 66	Parcial VPH 16,18, 31 45,51,52 y 59	PCR TR
	CLART	Genimoca	L1	CE	13 oncogénicos	SI	PCR
	Infinity HPV	Autogenomics	E1	CE	13 oncogénicos y 13 no-oncogénicos	SI	PCR
	InnoLiPA	Innogenetics	L1	CE	13 oncogénicos y 15 no-oncogénicos	SI	PCR
	Linear Array	Roche	L1	CE	13 oncogénicos y 24 no-oncogénicos	SI	PCR
RNA VPH	Multiplex HPV	Multimetrix	L1	N/D	13 oncogénicos y 11 no oncogénicos	SI	PCR
	Genotyping Kit						
	Papillocheck	Greiner	E1	CE	13 oncogénicos y 11 no-oncogénicos	SI	PCR
Proteínas VPH	E6 Protein	Arbor Vitae	E6	N/D	VPH 16, 18 y 45		Immunoensayo
	Cytoactiv	cytoimmun	L1	N/D	oncogénicos	N/D	Immuno tinción
					No especificados		
Proteína celular	CINtec Plus	mtm laboratorios	P16 ^{INK4a} /Ki-67	CE	N/D	N/D	Immuno tinción
	ProEx	Becton Dickinson	MCM2/Tcp2A	IVD Class	N/D	N/D	Immuno tinción
FISH	onco FISH	IKN SYS	3q/TERC	CE	N/D	N/D	FISH

CE=European Conformity; FDA=Food and Drug Administration; FISH=Fluorescence in situ hybridization; IVD=In vitro device; N/D=No disponible; NASBA=nucleic acid sequence-based amplification; PCR=Polymerase Chain Reaction; sFDA= State Food and Drug Administration (China); TMA= Transcription Mediated Amplification; *****Reacción cruzada con genotipos de VPH no-oncogénicos
Modificado de Shiffman et. al., 2011

fosfatasa alcalina, dichos anticuerpos están fijado a los pocillos de una microplaca de 96 pocillos. Los híbridos inmovilizados se detectan con un sustrato que reacciona con la fosfatasa alcalina y produce fotones. La luz emitida se mide en un luminómetro y se expresa como unidad relativa de luz (RLU).

La captura de híbridos es una técnica que puede aplicarse con facilidad en los laboratorios, ya que no requiere instalaciones especiales ni personal con amplia experiencia en técnicas moleculares. El método se limita a reportar con una sensibilidad de 96 a 98%, el resultado como positivo o negativo a VPH de alto riesgo y no permite distinguir cual es el tipo viral detectado¹⁵, así como también es sensible únicamente a los tipos virales antes mencionados, siendo de poca utilidad epidemiológica¹⁶.

Otra limitación de la CH-2 es su especificidad, ya que con frecuencia puede presentar falsos negativos, entre un 1 y un 8%, debidos a cifras bajas de carga viral del VPH (el umbral de detección es de 1pg/ml que corresponde a 5,900 genomas de VPH)¹⁷, a errores en la manipulación de la muestra o a la presencia de sustancias que puedan interferir con la técnica (cremas antifúngicas, gel anticonceptivo, entre otras)¹⁸. Los diagnósticos falsos negativos, tienen serias implicaciones médicas, financieras y legales, debido a que se pueden agrupar como sanas, a mujeres con LEIAG ó cáncer. Esta situación representa un problema bastante grave particularmente en Estados Unidos. Por otro lado, algunos autores coinciden en que la CH2, presenta reacciones cruzadas con genotipos de VPH no oncogénicos^{19,20}. Así, Shiffman y colaboradores en el año 2000, evaluaron 208 especímenes clínicos y encontraron que la HC2, presentaba reacciones cruzadas con los genotipos no oncogénicos 53, 66, 67,71 AE8(CP8061),73 y AE6(CP6108)²¹. Una segunda investigación de 448 especímenes clínicos, reportó reacciones cruzadas con los genotipos de 6, 11, 26, 40,42,66,83 y 84²². Aunque estos genotipos de VPH puedan causar anomalías citológicas detectadas a menudo por la citología, estas infecciones raramente o nunca progresan a cáncer. La implicación clínica de detectar éstos genotipos por HC2 no se ha evaluado²².

Se ha desarrollado una plataforma automática para CH2 llamada *The Rapid Capture System* (RCS), que consiste en un procesador robotizado de microplacas de 96 pozos que permite analizar un total de 352 muestras (4 microplacas) en un tiempo óptimo de 8 horas²³.

CH3

Un nuevo formato de la prueba de captura (HC3),

permite detectar y discriminar infecciones por tipos virales relacionados, como VPH 18 y 45 o 16, 31 y 35. La prueba HC3 puede ser utilizada para detectar y diferenciar estos tipos virales de muestras que contienen co-infecciones a varias concentraciones. La especificidad de la CH3 se logra mediante el uso adicional a la sonda de oligonucleótidos de captura marcados con biotina, que hibridan en regiones de secuencias únicas del DNA de genotipos blanco. La CH3 es tan sensible como la CH2, sin embargo, es más específica para detectar y diferenciar estos genotipos; además elimina el problema de reactividad cruzada que presenta CH2 que únicamente emplea la sonda^{17,24}.

PCR

Los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la sensibilidad y especificidad de la técnica dependen principalmente de factores tales como el juego de oligonucleótidos empleados, el tamaño del fragmento amplificado y la habilidad de detectar múltiples tipos virales²⁵. Los protocolos mayormente aceptados utilizan juegos de oligonucleótidos dirigidos a la región del gen L1 altamente conservada entre los tipos virales, entre ellos destaca el uso de los oligonucleótidos GP5+/6+ y los MY09/11 degenerados^{23,25,26,27}. En la actualidad uno de los sistemas más sensibles para determinar la infección por VPH, es la PCR en tiempo real, su utilización en estudios epidemiológicos enriquece la información clínica, ya que además de proporcionar datos sobre la presencia del virus con una gran sensibilidad, permite estimar con gran exactitud la carga viral¹⁶. Sin embargo, los 2 sistemas basados en la PCR mayormente aceptados y debidamente validados por la Unión Europea (CE Mark) son: The AMPLICOR HPV (AMP) y la prueba para genotipificación Linear Array HPV Genotyping Test (LA) (Roche Molecular System, Alameda,CA)^{28,29,30}.

AMPLICOR

La prueba AMPLICOR HPV Test (CE-IVD) es un prueba cualitativa *in vitro* para la detección del VPH en muestras clínicas. La prueba utiliza la amplificación de ADN objetivo mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) e hibridación de regiones amplificadas para la detección del ADN de 13 genotipos de VPH de alto riesgo (mismo genotipos detectados en CH2). En varios estudios, la prueba AMPLICOR HPV Test, ha demostrado una alta sensibilidad para las anomalías NIC II/III en seguimiento a largo plazo, y demuestra índices de desempeño adecuados para su uso en tamizaje primario de cáncer cervical^{31,32,33,34,35}.

LINEAR ARRAY

En la actualidad el sistema más sensibles y específicos para determinar la infección latente, sub-clínica y activa por VPH, es la prueba "Linear Array Genotyping Test" basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación de una secuencia específica de la región L1, utilizando un par de oligonucleótidos de amplio espectro, seguida de una hibridación con sondas específicas para tipificación individual 37 genotipos de alto y bajo riesgo: 6, 11, **16, 18**, 26, **31, 33, 35, 39**, 40, 42, **45, 51, 52**, 53, 54, 55, **56, 58, 59**, 61 62, 64, 66, 67, **68**, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39, and CP6180 (ver Tabla 1). Su utilización en estudios epidemiológicos enriquece la información clínica, ya que permite conocer el tipo específico de VPH y las infecciones múltiples, lo que posibilita el seguimiento particular de la persistencia de la infección con genotipos de alto riesgo y la identificación de infecciones con los genotipos más oncogénicos como el 16,18,31 y 45.

A nivel clínico determinar el genotipo que causa la infección, es muy importante ya que virus no oncogénicos pueden provocar anomalías citológicas sin implicar riesgo de cáncer. Por otro lado, la prevalencia de la infección por un mismo tipo de virus de alto riesgo es un excelente predictor del desarrollo de lesiones de alto grado³⁶. Así mismo, la importancia de la detección de las infecciones múltiples radica en que un alto porcentaje de las lesiones de alto grado posee infecciones múltiples, en comparación con las lesiones de bajo grado³⁷. En este sentido, las infecciones múltiples podrían reflejar una mayor tolerancia inmunológica a la infección por VPH, con la acumulación consecuente de infecciones. Desde este punto de vista, las infecciones múltiples pueden representar un marcador de persistencia de la infección, lo cual han demostrado algunos estudios como un posible factor de progresión lesiones, resistencia a tratamientos y una mayor posibilidad de infecciones subsecuentes^{38,39}. Entre los atributos de la prueba LA, se encuentra: su elevada sensibilidad 98% y especificidad 99%; además de incluir controles internos de amplificación (líneas de referencia de beta-globina baja y alta para evaluar la adecuación celular, la extracción y la amplificación individual para cada espécimen procesado) que le confieren elevado valor predictivo negativo, ausencia de reactividad cruzada y excelente reproducibilidad 99.8%^{40,41}.

Una prueba de tipificación de VPH por LA, permite separar a la población de pacientes con citología anormal, que es causada por VPH de alto riesgo, de aquellas en las que la anomalía citológica es causada por VPH de bajo riesgo u otra causa, detectar

de forma oportuna la presencia de VPH de alto riesgo en aquellas pacientes con epiteliomas y diagnóstico por Papanicolaou normal (infección transitoria o latente) y aquellas con infección activa y lesiones NIC II/III.

BIOMACADORES

Es importante mencionar que, después de la conclusión del proyecto genoma humano, la comunidad científica internacional ha vuelto su mirada al estudio de las proteínas (proteómica) como una herramienta clave en la investigación del origen, desarrollo y prevención de enfermedades crónico-degenerativas y el cáncer. Las transformaciones malignas involucran alteraciones en la expresión de proteínas con la sub-secuente proliferación clonal de las células alteradas. Estas alteraciones, pueden ser monitoreadas mediante el análisis de los perfiles proteicos, los cuales proveen información que podría ayudar a un pronóstico y diagnóstico más efectivo. Por tanto, la proteómica del cáncer incluye el análisis cuantitativo y cualitativo de las proteínas expresadas diferencialmente (biomarcadores) de los tejidos normales, pre-malignos y malignos^{42,43}. La proteómica puede ser útil para la búsqueda y detección temprana del cáncer en todas sus etapas en población de alto riesgo y en población abierta. Los biomarcadores representan una herramienta poderosa para el monitoreo del curso del cáncer y la evaluación de la eficacia y seguridad de nuevos agentes terapéuticos, también representan un importante indicador biológico del estatus (condición) y progresión del estado fisiológico de la célula en un momento específico. La mayor parte de los biomarcadores identificados hasta el momento son marcadores de transformación asociada a la infección por VPH y que se pueden identificar después o durante una infección activa, más que en la infección aguda. Los biomarcadores actualmente desarrollados pueden agruparse como sigue: 1.- marcadores de expresión de oncogenes de VPH (RNAm y proteínas), 2.- marcadores de proliferación celular (Ki-67, TOP2a, y p16) y 3.- marcadores de inestabilidad cromosómica (aumento del brazo del cromosoma 3q).

p16

Actualmente, el candidato más prometedor como biomarcador, pero solo después de una prueba positiva de VPH, es el p16. p16 es una proteína del ciclo celular que se expresa en relación con la quelación de pRb, por la acción de la oncoproteína E7. Por tanto su expresión se relaciona directamente con la infección por VPH de alto riesgo. La detección de p16 se hace por medios inmunohistoquímicos comunes. P16 se ha mostrado muy eficiente en

muestras histológicas como marcador de lesiones de alto grado en cérvix y en vulva y parece ser un buen marcador también en citología. Los estudios realizados hasta la actualidad indican que en ASCUS, p16 muestra buena sensibilidad y especificidad para lesiones de alto grado^{44,45}.

UTILIDAD DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO DE VPH, EN LA PREVENCIÓN Y CONTROL DEL CÁNCER CERVICOUTERINO.

En esta sección, se presentan algunas evidencias sobre la utilidad de la aplicación de estrategias basadas en la utilización de las técnicas de detección del VPH, en la prevención y control del cáncer cervicouterino.

1.- Tamizaje primario (estrategia preventiva de desarrollo de lesiones pre-invasivas y CaCu).

Numerosos estudios han demostrado el valor de la determinación de VPH de alto riesgo como estrategia en el tamizaje primario del CaCu, debido a que brinda una mayor sensibilidad y especificidad^{5,7}. Una prueba de detección y de VPH de primera intención, permite separar a una población de mujeres con LEIAG de aquellas sanas y de las que tiene infección con genotipos de bajo riesgo de VPH. Por tanto, una prueba positiva a VPH de alto riesgo, identifica a pacientes con infección latente (portadoras sanas, con citología y colposcopia negativas), aguda (productiva) ó crónica (transformativa) con una LEIAG y con cáncer invasor; además, permite discriminar a aquellas pacientes con citología anormal que no es causada por la infección por VPH de alto riesgo⁴⁶. Esta información permite al médico agrupar a las pacientes de acuerdo con el riesgo, para que éstas reciban terapias más adecuadas y eficaces.

2.- Tamizaje junto con la citología.

La detección del VPH junto con citología, es el candidato potencial más aceptado como medida de prevención del cáncer cervicouterino. En este sentido, todo los estudios sugieren que la adición de una prueba de VPH a la prueba de Pap en el tamizaje del CaCu, puede incrementar la identificación de lesiones precursoras de dicho cáncer hasta en 50-100%, además, parece añadir algunos años de vida a un costo razonable comparado con la citología repetidas^{46,47}.

Por un lado, una determinación negativa para VPH de alto riesgo, indica que la posibilidad de una lesión precancerosa de alto grado o de un cáncer es muy poco

probable. Cuando la citología y la prueba de VPH son negativas, el valor predictivo negativo para riesgo subsecuente de desarrollo de NIC II/III se eleva hasta un 99-100%^{48,49,50,51}, permitiendo espaciar los intervalos de revisiones hasta por 2 o 3 años. Se ha demostrado que la detección de DNA de VPH de alto riesgo en ausencia de anomalías citológicas, puede indicar la presencia de lesiones NIC II/III o puede predecir riesgo subsecuente a desarrollarlas durante los próximos 10 años^{50,52}. Éstas pacientes ameritan evaluación colposcópica para determinar si requiere algún tratamiento conservador o se remite para revisión anual con prueba de detección de VPH.

3. Confirmación de citologías no concluyentes ASC-US (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance) y LIEBG.

Los cambios citológicos ambiguos más comunes clasificados como ASC-US conforman el límite entre las interpretaciones citológicas normales y anormales. El diagnóstico citológico ASC-US corresponde a un resultado incierto que amerita revaloración urgente, ya que aproximadamente la mitad de las citologías clasificadas como ASC-US, es positiva para VPH carcinogénico⁵³. En Estados Unidos, el ASC-US es más común que el resto de las anomalías combinadas. El primer uso clínico de las pruebas de VPH aprobado por la FDA, fue para confirmar y clasificar las citologías ASC-US. La determinación de la presencia de VPH de alto riesgo permite identificar al grupo de mujeres que verdaderamente tienen riesgo de desarrollo de lesiones NIC II/III^{54,55}. Esto representa un potencial ahorro en los costos, debido a que una gran cantidad de estas pacientes que no se realizan una prueba para detectar VPH de alto riesgo, son remitidas a colposcopia y tratamiento conservador.

4. En los casos en que la colposcopia falla en detectar la lesión causante de la citología anormal.

La colposcopia ha demostrado ser una herramienta útil en el manejo de mujeres con patología cervical, pero es fundamental que a este procedimiento no se le pida más de lo que puede ofrecer. En la práctica colposcópica las fallas pueden emanar de 5 fuentes: 1) la sobreinterpretación de las lesiones: la más común es considerar una lesión de bajo grado LBG, como lesión de alto grado AG. 2).- colposcopias no satisfactorias: debidas a que la unión escamocolumnar no es visible o bien, que la lesión penetra al canal endocervical donde es difícil de observar, 3)- la post-menopausia: cuando la unión escamo columnar se desplaza al interior del canal o por atrofia epitelial, que permite visualizar vasos que, siendo normales, se

pueden interpretar erróneamente⁵⁶, 4)- el embarazo: dificulta la colposcopia por el aumento de volumen cervical y la relajación de paredes vaginales que impiden la correcta visualización; además el color violáceo de la mucosa dificulta la interpretación de las lesiones acetoblancas y los vasos normales se hacen visibles por la congestión⁵⁷. - 5).- errores en la toma de la biopsia. La detección de VPH de alto riesgo nos ayuda a resolver cada una de estas circunstancias, confirmando si la lesión erróneamente interpretada es causada por algún VPH de alto riesgo y mejor aun, determinar la presencia de VPH de alto riesgo cuando es difícil observar alguna lesión⁵⁸.

5. Determinar la persistencia de genotipos de alto riesgo asociados con progresión de lesiones cervicales y carcinógenesis cervical.

La progresión de lesiones cervicales no ocurre en la ausencia de VPH de alto riesgo. Por lo tanto, en aquellas pacientes negativas a una prueba de VPH de alto riesgo, las revisiones pueden espaciarse hasta un año. Ahora bien, paciente positiva a VPH alto riesgo, deben ser sometidas a colposcopia. Se ha reportado que la persistencia o recurrencia con uno o varios genotipos de VPH de alto riesgo tienen 327 veces más riesgo de desarrollar NIC II/III que aquellas sin VPH⁵⁹.

6. Establecer la efectividad de un tratamiento.

A pesar de que algunas mujeres reciben tratamiento oportuno cuando se les detectan lesiones pre-invasivas NIC II/III, se ha reportado un 5-20% de recurrencia post tratamiento, lo cual implica una mayor probabilidad de avance a cáncer invasor y gasto en tratamientos. Actualmente, se utiliza la citología para el seguimiento de éstas pacientes y la colposcopia en pacientes con citologías anormales. La determinación de VPH de alto riesgo, confirma la erradicación o persistencia del VPH de alto riesgo, necesario para el desarrollo del cáncer. Aquella paciente con determinación de VPH de alto riesgo negativa, puede regresar con toda seguridad a su rutina con seguimiento anual^{60,61}.

7.- Detectar genotipos específicos previos y posteriores a la aplicación de una vacuna (16 y 18).

A pesar de los alentadores resultados obtenidos con las vacunas profilácticas y terapéuticas contra el VPH, aun permanecen ciertas cuestiones que deben ser atendidas. Incluso si las actuales vacunas manifiestan su efectividad contra los tipos específicos de VPH (16,18,11,6); se ignora el tiempo que puede durar la protección y el impacto que puede tener este tipo de protección en la historia natural del CaCu. Las

pruebas de tipificación de VPH representan una herramienta poderosa para el seguimiento y vigilancia epidemiológica en los programas de vacunación, en el monitoreo de la reducción de la incidencia VPH o de lesiones pre cancerosas^{62,63}. Por otro lado, la detección de genotipos específicos (16, 18, 6, 11) previos a la introducción de una vacuna, podrá asegurar la protección y afectividad de la misma, cuando se haya confirmado que la paciente es negativa a los genotipos contra los que está producida dicha vacuna. Ahora bien, con el conocimiento de que la protección conferida por la vacunas es específica por tipo viral, bajo los actuales prototipos de vacunas, es probable que durante décadas la prevención del cáncer requiera protocolos que combinen el tamizaje y la vacunación.

8.- Adenocarcinoma

Aunque menos frecuente, el VPH también puede causar adenocarcinoma, algunos incluso tipo histológicos, más raros aún. Varios autores coinciden en que hay poca evidencia de la eficacia en la prevención de adenocarcinoma con los actuales procedimientos de diagnóstico. Las pruebas de detección de VPH son especialmente útiles para la detección de adenocarcinomas, que pueden ser difíciles de encontrar usando la citología⁶⁴.

Finalmente, es importante mencionar que, ya sea de forma independiente o combinada con la citología, existen muchas formas de incorporar las pruebas de VPH en diferentes edades, situaciones y en varios intervalos de tamizaje. Las investigaciones científicas que han evaluado distintas estrategias, demuestran que pueden ser más eficaces y costo efectivas que los actuales procedimientos para la prevención y control del CaCu (asignando como es debido, el valor infinito que tiene una sola vida, sin importar el costo financiero). En términos de rentabilidad se podría mejorar la prevención del cáncer cervicouterino, sustituyendo las citologías frecuentes, por la vacunación y las pruebas de detección de VPH.

REFERENCIAS

- 1.-Schiffman M, Castle PE, Jeronimo y col. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007;370(9590):890-907.
- 2.-Franceschi S, Cuzick J, Herrero R y col. EUROGIN 2008 roadmap on cervical cancer prevention. *Int J Cancer*. 2009;125(10):2246-2255.
- 3.-Bosch FX, Lorincz A, Munoz N y col. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55(4):244-265.
- 4.- Qiao YL, Sellors JW, Eder PS y col. A new HPV-DNA test for cervical-cancer screening in developing regions: a cross-sectional study of clinical accuracy in rural China. *Lancet Oncol* 2008;9(10):929-936.
- 5.-Kitchener HC, Almonte M, Thomson C y col. HPV testing in combination with liquid-based cytology in primary cervical screening (ARTISTIC): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2009;10(7):672-682.
6. Bulkman NW, Berkhof J, Rozendaal L y col. Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomized controlled implementation trial. *Lancet* 2007;370(9601):1764-1772.
7. Naucier P, Ryd W, Tornberg S y col. Efficacy of HPV DNA testing with cytology triage

- and/or repeat HPV DNA testing in primary cervical cancer screening. J Natl Cancer Inst 2009;101(2):88–99.
- 8.- Gravitt PE, Schiffman M, Solomon D y col. A comparison of linear array and hybrid capture 2 for detection of carcinogenic human papillomavirus and cervical precancer in ASCUS-LSIL triage study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008;17(5):1248–1254.
- 9.-The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ALTS) Group. Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomized trial. The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ALTS) Group. J Natl Cancer Inst 2000;92(5):397–402.
- 10.-Hinselman H, Verbesserung der Inspektionmöglichkeiten von Vulva. Vagina und Portio. Münch Med Wschr 1925;72:1733-1736
- 11.-Almirón S, Navarro S, Rojas M y col. Correlación histopatológica de la expresión por el virus de papiloma humano en lesiones premalignas y malignas de cuello uterino. Revista de postgrado de la vía cátedra de medicina 2003;134:19-12.-NADNa K, Mc Crory DC, Myers ER y col. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for DNA follow-up of cervical cytology abnormalities; a systematic review. An Intern Med 2000 May; 132(10):810-819.
- 13.-Fahey MT, Irwig L y Macaskill P. Meta-analysis of papa test accuracy. Am J Epidemiol 1995 Apr; 141(7):680-689.
- 14.-Shiffman M, Wentzensen N, Wacholder S y col. Human Papillomavirus Testing in the Prevention of Cervical Cancer. J Nat Cancer Inst 2011; 103(5):1-16
- 15.-Ault K. Human papilloma virus infections: diagnosis, treatment, and hope for a vaccine. Obstet Gynecol Clin N Am 2003;30:809-817.
- 16.-Gravitt P, Burk R, Lorincz A, Herrero R y col. A comparison between real-time polymerase chain reaction and hybrid capture 2 for human papillomavirus DNA quantitation. Cancer Epidemiol. Biomark Prev 2003;12:477-484.
- 17.-Lorincz A y Anthony J. Advances in HPV detection by Hibrid Caprute R. Pap Report 2001;12(6):145-154.
- 18.-Burd E. Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev. 2003;16:1-17
- 19.-Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A y col. HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high-risk province of Costa Rica. J Am Med Assoc 2000;283: 87–93.
- 20.-Gravitt PE, Schiffman M, Solomon D y col. A comparison of linear array and hybrid capture 2 for detection of carcinogenic human papillomavirus and cervical precancer in ASCUS-LSIL triage study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008;17(5):1248–1254.
- 21.-Peyton CL, Schiffman M, Lorincz AT y col. Comparison of PCR- and hybrid capture-based human papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. J Clin Microbiol 1998;36: 3248–3254.
- 22.-Terry G, Ho L, Londesborough P y col. Detection of high risk HPV types by the hybrid capture 2 test. J Med Virol 2001;65:155–162.
- 23.-Lórinz A. Screening for cervical cancer: new alternatives and research. Sal Pub Mex 2003; 45:376-387.
- 24.-Lorincz A y Anthony J. Hybrid CaptureR: a system for nucleic acid detection by signal amplification technology. In: Van Dyke K, Van Dyke C, Woodfork K, ed. Luminescence biotechnology: instruments and applications. Boca Raton, FL: CRC Press; 2002: 149-158.
- 25.-Iftner T y Villa L. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. J Natl Cancer Inst Monogr 2003; 31:80-88.
- 26.-Stoler MH. HPV for cervical cancer screening: is the era of the molecular pap smear upon us? J Histochem Cytochem 2001;49:1197-1198
- 27.-Herrington C. Self testing for human papillomaviruses. J Clin Pathol 2002;55:408-409
- 28.-Monsonogo J, Bohbot JM, Pollini G y col. Performance of the Roche AMPLICOR human papillomavirus (HPV) test in prediction of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in women with abnormal PAP smear. Gynecol Oncol 2005;99:160–168.
- 29.-Sandri M, Lentati TP, Benini E y col. Comparison of the Digene HC2 assay and the Roche AMPLICOR human papillomavirus (HPV) test for detection of high-risk HPV genotypes in cervical samples. J Clin Microbiol 2006;44:2141–2146.
- 30.-van Ham MA, Bakkers JM, Harbers GK y col.. Comparison of two commercial assays for detection of human papillomavirus (HPV) in cervical scrape specimens: validation of the Roche AMPLICOR HPV test as a means to screen for HPV genotypes associated with a higher risk of cervical disorders. J Clin Microbiol 2005;43:2662–2667.
- 31.-Wahlström C, Iftner T, Dillner J y col. Population-based study of screening test performance indices of three human papillomavirus DNA tests. J Med Virol 2007 Aug;79(8):1169-75.
- 32.-Mo LZ, Monnier-Benoit, S, Kantelip B y col. Comparison for AMPLICOR and Hybrid Capture II assays for high risk HPV detection in normal and abnormal liquid-based cytology: Use of INNO-LiPA Genotyping assay to screen the discordant results. J Clin Virology 2008; 41:104–110.
- 33.-De Francesco MA, Gargiulo F, Schreiber C y col. Comparison of the AMPLICOR human papillomavirus test and the hybrid capture 2 assay for detection of high-risk human papillomavirus in women with abnormal PAP smear. J Virol Methods 2008 Jan;147(1):10-7.
- 34.-Stevens MP, Garland SM, Rudland E y col. Comparison of the Digene Hybrid Capture 2 assay and Roche AMPLICOR and LINEAR ARRAY human papillomavirus (HPV) tests in detecting high-risk HPV genotypes in specimens from women with previous abnormal Pap smear results. J Clin Microbiol 2007 Jul;45(7):2130-2137.
- 35.-Carozzi F, Bisanzi S, Sani C y col. Agreement between the AMPLICOR Human Papillomavirus Test and the Hybrid Capture 2 assay in detection of high-risk human papillomavirus and diagnosis of biopsy-confirmed high-grade cervical disease. J Clin Microbiol 2007 Feb;45(2):364-9.
- 36.-Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J y col. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia JAMA 2001;286(24):3106-14..
- 37.-Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L y col. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. J Clin Microbiol 1999;37(8):2508-2517.
- 38.-Janet G, Baseman GJ y Koutsky AL. The epidemiology of human papillomavirus infections. J Clin Virol 2005;32:16-24.
- 39.-Wallin KL, Wiklund F, Angstrom T y col. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. N Engl J Med 1999;341:1633-1638.
- 40.-Coutlée F, Rouleau D, Petignat P. Enhanced Detection and Typing of Human Papillomavirus (HPV) DNA in Anogenital Samples with PGM Y Primers and the Linear Array HPV Genotyping Test. J Clin Microbiol 2006;44(6):1998–2006
- 41.-Kornegay RJ, Roger M, Davies OP y col. International proficiency study of a consensus L1 PCR assay for the detection and typing of human papillomavirus DNA: evaluation of accuracy and intralaboratory agreement. J Clin Microbiol 2003; 41(3): 1080–1086.
- 42.-Liang RQ, Tan CY y Ruan KC. Colorimetric detection of protein microarrays based on nanogold probe coupled with silver enhancement. J Immunol Methods 2004;285(2): 157-163.
- 43.-Guschin D, Yershov G, Zaslavsky A y col. Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA, and proteins microchips. Anal Biochem 1997;250(2):203-211.
- 44.-Wentzensen N, Bergeron C, Cas F y col. Triage of women with ASCUS and LSIL cytology: use of qualitative assessment of p16INK4a positive cells to identify patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia. Cancer 2007;111(1):58–66.
- 45.-Denton KJ, Bergeron C, Klement P y col. The sensitivity and specificity of p16(INK4a) cytology vs HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL pap cytology results. Am J Clin Pathol 2010;134(1):12–21.
- 46.-Lazcano PE, Alonso RP, Ruiz MJA, Hernández AM. Recomendaciones para los programas de detección oportuna del cáncer cervicouterino en los países en vías de desarrollo: necesidad de equidad y desarrollo tecnológico. 2ª edición. En Cáncer cervicouterino diagnóstico, prevención y control. Patricia Alonso, Eduardo C. Lazcano y Mauricio Hernández. 2006; 258-259.
- 47.-Mandelblatt JS, Lawrence WF, Womack SM y col. Benefits and costs of using HPV testing to screen for cervical cancer. JAMA 2002; 287(18):2372-2381.
- 48.-Belinson J, Qiao YL, Pretorius R y col. Shanxi Province Cervical Cancer Screening Study: across-sectional comparative trial multiple techniques to detect cervical neoplasia. Gynecol Oncol 2001;83:439-444.
- 49.-Ratnam S, Franco EL y Ferenczy A. Human papillomavirus testing for primary screening of cervical cancer precursors. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2000;9:945-951.
- 50.-Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT y col. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. J Natl Cancer Ins. 2005;97(14):1072–1079.
- 51.-Dillner J, Rebolj M, Birembaut P y col. Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. BMJ 2008;337:a1754.
- 52.-Jeronimo J, Schiffman M. Colposcopy at a crossroads. Am J Obstet Gynecol 2006;195(2):349–353
- 53.-The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance /Low Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ALTS) Group. Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low grade squamous intraepithelial lesions : baseline data from a randomized trial. J Natl Cancer Inst 2000;92(5):397-402.
- 54.-ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance. Am J Obstet Gynecol 2003;188(6):1383–1392.
- 55.-Arbyn M, Buntinx F, van Ranst M y col. Virologic versus cytologic triage of women with equivocal pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. J Natl Cancer Inst 2004;96(4):280–293.
- 56.-Toplis PJ, Casemore V, Hallman N y col. Evaluation of colposcopy in the postmenopausal woman. Br J Obstet Gynaecol 1986;93:843-847.
- 57.-Campion MJ y Sedlacek TV. Colposcopy in pregnancy. Obstet Gynecol Clin North Am 1993;20:153-163.
- 58.-Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ y col. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: A prospective study. Lancet 1999;354(9172):20-25
- 59.-Riveiro JC. Importancia de la tipificación del virus del papiloma humano (VPH) Rev Venez Oncol 2002;14(3):175-177
- 60.-Nobbenhuis MA, Meijer CJ, van den Brule AJ y col. Addition of high-risk HPV testing improves the current guidelines on follow-up after treatment for cervical intraepithelial neoplasia. Br J Cancer 2001;84(6):796-801.
- 61.-Cuzick J y Sasieni P. Estimates of the cost impact of introducing HPV testing into a cervical screening programme. In: Franco E, Monsonogo J, eds. New developments in cervical cancer screening and prevention. Oxford: Blackwell Science, 1997: 364-372.
- 62.-Dillner L y Dillner J. International quality assurance of human papillomavirus testing. Cent Eur J Public Health 2008;16:16–20.
- 63.-Ferguson M, Wilkinson DE, Zhou T. WHO Meeting on the standardization of HPV assays and the role of the WHO HPV. Laboratory Network in supporting vaccine introduction held on 24–25 January 2008, Geneva, Switzerland. Vaccine 2009;27:337–47.
- 64.-Sasieni P, Castanon A y Cuzick J. Screening and adenocarcinoma of the cervix. Int J Cancer. 2009;125(3):525–529.