

## G E N E T I C A

## Captura Híbrida de ADN del Virus de Papiloma Humano en la Detección de Tipos de Alto Riesgo para el Cáncer de Cérvix Uterino (Revisión Bibliográfica)

Gabriela Román Ulloa \*

### S U M M A R Y

Some methods have been used for detection of High Risk Human Papillomavirus DNA, specifically for screening of cervical carcinoma in women. Compare and understand the real utility of these methods has become very important for physicians in the dialy clinical practice, and research. This is a review of the literature about the DNA Hybrid Capture Test HC2, which is available in Costa Rica and pretend to compare this method with the others, and to evaluate its specificity and sensibility. The conclusion is as follows: HC2 is very useful detection method in women with ASCUS who need more diagnostic studies, and specially in women older than 30. But results could be susceptible to misunderstanding, because of

the possibility of cross reactions with low risk virus, and is a fact that many infections by HPV are transient. The traditional histological test Papanicolau (PAP) is still the gold standard for detection of cervical lesions; DNA detection by HC2 could add useful information because of its high sensibility, and both tests give valuable data. But the low specificity of DNA HC 2 is a warning for not making unnecessary studies; the clue is to use the test in the individual context, to obtain a complete clinical study of each patient.

### I N T R O D U C C I O N

Las Técnicas de Detección de ADN Viral y su uso en la detección

del Virus de Papiloma Humano. El Virus de Papiloma Humano tiene un genoma de aproximadamente 8000 pares de bases y se aloja en las células basales del epitelio escamoso estratificado y en las células metaplásicas de la unión cervicouterina (3). La infección del epitelio cervical uterino por el Virus de Papiloma Humano (VPH) está considerado un apoyo del proceso oncogénico que lleva al desarrollo del cáncer en ese sitio (5). El riesgo de desarrollar cáncer se ha relacionado con el tipo de VPH presente en las células epiteliales (23). Según su potencial oncogénico se pueden clasificar en un grupo de bajo riesgo oncogénico los subtipos 6,11, 42, 43 y 44; en un grupo de riesgo intermedio a

\* Médico General, Universidad de Costa Rica.

alto los subtipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 65 y 66 (5) y de entre ellos se le asigna mayor poder oncogénico a los subtipos 16 y 18 (2)(4)(23). La presencia del subtipo 16 ha sido corroborada en numerosos estudios y ha sido relacionado con un 50% de los carcinomas de cérvix (3); el subtipo 18 aparece como el segundo más importante en unos estudios (4)(16)(12). Aunque la mayoría de los pacientes con displasia epitelial demuestran infección por cualquier tipo de virus, su identificación puede ser de utilidad para el manejo clínico, por lo que se propone su uso junto a la citología exfoliativa (5). Los métodos actualmente utilizados en investigación son la captura de híbridos de ADN, Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), ensayos inmunohistoquímicos, la Hibridización in situ y el más nuevo, un sistema de amplificación colorimétrico (18),(9). La evidencia de la utilidad de las pruebas de ADN para detección de VPH en relación con el Cáncer de Cérvix Uterino (CCU) ha incrementado con el tiempo, ya que junto a la gran reducción de la incidencia lograda con los programas de Citología exfoliativa para tinción de Papanicolau (PAP), se sugiere que su realización simultánea disminuye la probabilidad de pasar por alto un resultado falso negativo del PAP (18). Incluso se afirma que su sensibilidad en algunos casos es mucho más alta que la citología (18) y que puede

ser de utilidad en los casos en que el resultado del frotis se valora como "borderline" y en los controles posteriores de mujeres que han sido tratadas por Neoplasia Intraepitelial de Alto Grado (11). Además puede ser útil en referir a estudios de colposcopia a las mujeres con citología de "Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance" o ASCUS ("borderline") porque la frecuencia de positividad por VPH más ASCUS que resultan con Lesiones Intraepiteliales confirmadas por biopsia, es de un 31.4% (17)(4). Varios estudios han revelado también que en general los test de ADN para VPH tienen un valor predictivo negativo superior al PAP (11).

#### **El Método de Captura Híbrida de ADN en comparación con otros métodos.**

Los ácidos nucleicos al igual que otras macromoléculas ocupan sitios específicos en células y tejidos, por lo que se han desarrollado técnicas donde secuencias específicas de ADN denominadas "probes" se usan del mismo modo que los anticuerpos marcados, por localizar secuencias in situ (1). Inicialmente se marcaban con isótopos radioactivos, pero actualmente se marcan químicamente (1). La hibridización in situ (ISH) es fácil de realizar, se puede realizar con extendido celular o parafinado, pero su problema es la baja sensibilidad (5). La reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) tiene una sensibi-

lidad extremadamente alta y puede ser realizada en extendidos de células y en material parafinado. Su mayor desventaja es la contaminación, pues requiere de un laboratorio con la infraestructura necesaria (5),(1). La PCR ha servido desde hace años para asociar la presencia de una elevada carga viral con la progresión de las lesiones intraepiteliales (13), (15) y establecer relación etiológica (22). Su aplicación in situ también ha sido realizada, y podría aumentar la habilidad para encontrar unas pocas copias de las secuencias de interés fijadas a los tejidos y células (26). La captura de híbridos de tercera generación permite aplicar el tamizaje a grandes poblaciones (18), está disponible, es sensible y fácil de realizar pues se toma con un cepillo semejante al de citología exfoliativa. Su desventaja radica en que no puede utilizarse en material parafinado y sólo puede dar el resultado de grupo de "bajo" o "alto" riesgo (5). Por el momento el Sistema de Captura Híbrida II (HC II) se ha utilizado como "Gold Standard" en la práctica clínica (5) y el único hasta el año 2006 aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para detección de rutina del Virus de Papiloma Humano y incluso se utiliza actualmente en muchos laboratorios privados en Costa Rica. Consiste en desnaturalizar el ADN y mezclar con un híbrido que funciona como sonda; luego se agrega anticuerpos ligados a un marcador enzimático, que en los sitios don-

de ocurre unión del híbrido con secuencias complementarias, emite quimioluminiscencia. Usa un formato de hibridización líquida seguido de amplificación de señal para detectar 13 subtipos diferentes de VPH de alto riesgo. (11).

Unos cuantos estudios se han centrado en la detección del subtipo considerado de mayor riesgo, el VPH 16. Se reportó que la PCR tiene una sensibilidad mucho mayor que la hibridización in situ y mediante cultivos con células con genoma de VPH 16 comparadas con controles, se demostró nuevamente que el método más sensible es la PCR, y la Captura Híbrida de ADN para el virus obtuvo el índice mayor de falsos negativos (7). En cuanto a las técnicas de hibridización in situ y Captura Híbrida de ADN, un estudio del 2004 reporta que la Captura Híbrida 2 (HC2) mostró más sensibilidad con respecto a ISH en los casos de citología normal o "borderline", sin diferencia cuando había displasia reportada. Cuando se realizó biopsia, la tasa de resultados positivos también fue mayor para HC2, igualmente significativo sólo en los casos de histología normal o levemente alterada (11). Sin embargo, otro estudio del mismo año compara la agudeza de estos mismos dos métodos en predecir los resultados de biopsia de citologías con alteraciones leves de tipo ASCUS o de lesión intraepitelial de bajo grado; los resultados fueron

sensibilidad de 97% para ISH y de 79% para HC, especificidad de 86% para ISH y de 56% para HC. Además el valor predictivo positivo para ISH fue de un 48% versus un 19% de HC, y el valor predictivo negativo de 99% para ISH y de 95% para HC (20). Otro estudio semejante llega a la conclusión de que el test de ADN HC2 obtuvo una sensibilidad de un 89.5%, una especificidad de 45.8% y un valor predictivo negativo de un 95.3% (24). Un estudio del 2006 sometió a prueba los resultados para HC 2 que aparecían de manera repetida como inespecíficos, mediante la realización de una prueba de PCR. El resultado fue una tasa de 11.3% de falsos negativos y un 19.1% de falsos positivos (25). Esta elevada tasa de falsos positivos podría estar relacionada con reacciones cruzadas, un estudio reportó que de 111 casos positivos mediante el método de HC 2, hubo un 4.31% de falsos negativos con una fuerte señal de quimioluminiscencia, y 1.9% se relacionaron con reacción cruzada para un subtipo viral de bajo riesgo (8),(28). Incluso se cuenta con un estudio hecho en la población de Costa Rica sobre esta reactividad cruzada, donde se tomó una muestra de una población con un resultado positivo para captura híbrida 2 usando "probe" B (HC2-B), que luego resultó negativa con las pruebas específicas de PCR específicas MY09 y 11. De los 954 especímenes iniciales, 719 fueron positivos para un tipo inespecífi-

co de VPH y 131 fueron positivos sólo para subtipos de bajo riesgo, no oncogénicos (6).

Se analizó la relación entre la fuerza de la señal de PCR y el diagnóstico erróneo positivo con HC2-B, también se revisó las citologías. El análisis estadístico los llevó a concluir que la reactividad cruzada ocurría más entre las mujeres menores de 30 años que entre las mayores a esta edad. De modo que HC2-B resultó tener reacción cruzada con los subtipos 11,53, 61, 66, 67, 70, 71 y 81. Otro resultado interesante fue la relación de estas reacciones cruzadas con citología normal y biopsia con resultado de neoplasia Intraepitelial NIC 2. Pero en mujeres con citología levemente alterada, la reacción cruzada redujo la agudeza de la prueba HC2-B, pues disminuyó su especificidad sin una ganancia compensatoria en la sensibilidad (6) También se ha realizado comparación de los métodos de HC2 y PCR en el seguimiento de pacientes tratadas por Neoplasia Intraepitelial Cervical. De los casos inicialmente positivos por HC2 que resultaron negativos por PCR, la mayoría habían tenido resultados de citología "borderline" (28).

#### **El Método de Captura Híbrida de ADN en la práctica clínica**

Numerosos estudios demostraron la utilidad de la prueba de HC2 para detectar el riesgo en los casos donde la citología exfoliativa

podría fallar, y que la sensibilidad del método parece aumentar con la edad, ya que se observa sobre todo en mujeres mayores de 30 años, que la sensibilidad con respecto a la citología exfoliativa es superior en un 30 % (18), si bien es cierto que la positividad en los estudios de detección de VPH suele tener una frecuencia mayor en las menores de 30 años (17). La sensibilidad relativa del test de ADN HC2 fue evaluada en un estudio del año 2004, y demostró ser de un 98% en comparación con el PAP convencional; la especificidad fue semejante a la del hallazgo de ASCUS en la citología, pero más baja al compararlo con lesiones intraepiteliales de bajo grado. Dicho de otro modo, cuando las lesiones son más severas, es más fácil identificarlas aún con la citología (21). En este mismo estudio, sólo hubo pocas biopsias lesiones de bajo grado detectadas en la histología que no fueron detectadas por HC 2, lo que habla de su sensibilidad alta (21). El valor predictivo negativo de HC2 es muy alto; por otro lado, se ha estimado que las mujeres con un resultado positivo tienen aproximadamente 7.2 veces mayor riesgo de desarrollar una lesión precursora de cáncer en relación con la población general (24). La combinación del test HC2 junto con citología ha demostrado una sensibilidad realmente mejor que la citología sola, está disponible y es fácil de usar; su problema es la baja especificidad y posibilidad de

reacción cruzada (28),(19), para lo cual han surgido varias explicaciones, como el hecho de que los subtipos 53, 66, 67 y 70 pertenecen a la misma línea filogenética la mayoría de los subtipos oncogénicos. Segundo, que haya una pérdida de información en la prueba de PCR contra la que se ha comparado (6).

Un metaanálisis publicado en el 2004 llega a varias conclusiones interesantes. En general los test utilizados de tipo HC 2 y otros métodos en los estudios demostraron una sensibilidad de un 84.4% y una especificidad de un 72.9%. Si se toma en cuenta los ocho estudios con HC2, la sensibilidad aumenta a un 94.8% y la especificidad disminuye a un 67.3% (2). Los autores no recomiendan el uso de tests para detección de VPH de manera generalizada en la atención primaria, pero sí sería muy útil para aportar datos a las citologías con alteraciones inespecíficas. Además concluyen que la sensibilidad es superior a la del PAP en los casos de ASCUS, pero la diferencia no es tanta si el grado de la lesión es mayor; en ambos casos la especificidad es baja (2). En general, concluyeron que HC2 es un mejor método de detección que repetir la citología en las mujeres con ASCUS (2), (10), (14) (16). La mayor utilidad radica en el seguimiento que se le da a las pacientes con citología normal y HPV test positivo, quienes posteriormente podrían desarrollar una carcino-

ma de cérvix (14). En cuanto a las mujeres con citologías normales, se debe tener cuidado al manejar los datos obtenidos porque usar la HC 2 solamente, podría llevar a cantidades de referencias a colposcopia sin fundamento real (21). Por esta razón es que no se recomienda sustituir la citología normal con un test de ADN, sino usarlos juntos para obtener mayor información cuando esta se requiera. Muchas de estas infecciones son temporales o no progresan a cáncer, por lo que se corre el riesgo de alarmar a las pacientes o incurrir en estudios diagnósticos e intervenciones innecesarias (18). Se debe tener en cuenta los resultados de un estudio de cohorte realizado a 10 años con 20 000 mujeres con un test positivo por VPH, donde sólo un 7% de ellas desarrollaron cáncer. El mecanismo por el cual el sistema inmune combate la infección todavía no se ha descrito (3).

## CONCLUSIONES

La gran importancia de las pruebas de detección de ADN en general, es su utilidad en detectar un factor de riesgo, que es el principal y está íntimamente relacionado con la etiología del cáncer: la infección celular del epitelio por el Virus de Papiloma Humano. Luego de realizar esta revisión queda claro que a nivel de métodos de detección, la captura híbrida no logra superar a la Reacción en Cadena de Polime-

rasa en cuanto a su sensibilidad. Incluso algunos estudios catalogan como mejor la técnica de Hibridación in situ. Las desventajas de la prueba son las reacciones cruzadas que se han reportado con virus de bajo riesgo, lo cual pone en riesgo al clínico de realizar intervenciones innecesarias. Otra desventaja es su alto costo y que no se puede especificar con la prueba el subtipo viral. No obstante, teniendo en cuenta que en la práctica clínica resulta importante estratificar aunque sea en alto y bajo riesgo, y que es una prueba disponible en el medio, su utilidad es enorme. Las otras pruebas son más difíciles de realizar, por eso generalmente se usan en investigación. Además, ha demostrado ser una prueba mucho más sensible que la citología exfoliativa para Papanicolau, si bien esta última prueba no puede ser sustituida ya que a veces se encuentran cambios patológicos provocados por otros factores etiológicos o por virus catalogados de menor riesgo. La prueba está claramente indicada para mujeres que tengan un resultado de ASCUS en la citología, para su seguimiento y agregar datos al diagnóstico. La sensibilidad apoya este seguimiento porque en caso de un resultado de HPV positivo se debe hacer controles más seguidos. Un resultado positivo obliga a vigilar más de cerca de una paciente, con el fin de detectar a tiempo cualquier lesión precancerosa. Dado que la especificidad es baja, un resultado

negativo no descarta la presencia de VPH de alto riesgo, por lo que nuevamente es necesario la toma conjunta de la citología que de ser negativa otorga mayor tranquilidad. En el caso de una citología positiva con resultado de VPH negativa, es más importante el resultado de la citología.

Lo mejor podría ser aplicar la prueba a la población mayor de 30 años donde puede ser más su utilidad por la correlación observada de los resultados e infección persistente, y por la frecuencia de lesiones a esta edad. En poblaciones de menor edad se debe tener en cuenta la evolución normal de la enfermedad que tarda años en los casos en que se desarrolla el cáncer, y muchas veces el sistema inmune gana la batalla. Por esto más bien la prueba HC 2 sirve para definir el seguimiento, la necesidad de repetir la prueba y valorar resultados de tratamiento. No es un resultado aislado, sino que debe ser valorado en conjunto con la historia clínica de la paciente y el resultado de la citología principalmente. No se debe caer en el error de alarmar a una persona y someterla a estudios innecesarios; antes se debe observar la evolución.

## RESUMEN

Para la detección de ADN de los tipos virales de riesgo en el desarrollo de Cáncer de Cérvix Uteri-

no, existen varios métodos utilizados tanto en investigación como en práctica clínica. La valoración de la utilidad de estos métodos es fundamental para el médico costarricense, tanto para la crítica adecuada de las investigaciones, como la interpretación de los resultados en la clínica. La presente revisión pretende informar sobre estos métodos y en especial evaluar la efectividad del método de Captura Híbrida de ADN de Virus de Papiloma Humano HC 2, en función de su sensibilidad y su especificidad, y en comparación con los otros métodos. Se concluye que el método HC 2 tiene gran utilidad en la población femenina con diagnóstico de ASCUS para su seguimiento, y en detección se debe tener en cuenta factores como el carácter pasajero de algunas infecciones por VPH y las reacciones cruzadas que pueden ocurrir con subtipos virales de bajo riesgo. Además es especialmente útil en mujeres de 30 años o más. En absoluto queda claro que la prueba no sustituye la Citología Exfoliativa para tinción de Papanicolau (PAP), pero debido a su alta sensibilidad, puede aportar datos de utilidad para definir el seguimiento. Pero la baja especificidad alerta sobre la posibilidad de incurrir en estudios diagnósticos y afección psicológica innecesarias; lo importante es la interpretación de la prueba dentro del contexto clínico de cada paciente.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alberts. *Molecular Biology of The Cell*. III. Methods. 8. Manipulating Proteins, DNA and RNA. www.ncbi.com.
2. Arbyn, Marc et al. Virologic Versus Cytologic Triage of Women With Equivocal Pap Smears: A Meta-analysis of the Accuracy To Detect High-Grade Intraepithelial Neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*. Vol 96, No. 4, February 18, 2004.
3. Ault, Kevin A. Clinical Study: Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections in the Female Genital Tract. *Infectious Disease in Obstetrics and Gynecology*. 2006, article ID 40470, Pages 1-5.
4. Beerens, E., et al. Human papillomavirus DNA detection in women with primary abnormal cytology of the cervix: prevalence and distribution of HPV genotypes. *Cytopathology*. 2005, 16, 199-205.
5. Birner, Peter M.D. et al. Signal-Amplified Colorimetric in situ Hybridization for Assessment of Human Papillomavirus Infection in Cervical Lesions. *Mod Pathol* 2001; 14 (7): 702-709.
6. Castle, Phillip E. et al. Restricted Cross-Reactivity of Hybrid Capture 2 with Nononcogenic Human Papillomavirus Types. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. Vol 11, 1394-1399. November 2002.
7. Cavuslu, Saban et al. Analytic Sensitivities of Hybrid-Capture, consensus and Type-Specific Polymerase Chain Reactions for the Detection of Human Papillomavirus Type 16 DNA. *Journal of Medical Virology* 49: 319-324 (1996).
8. Cremoux, Patricia et al. Efficiency of the Hybrid Capture 2 HPV DNA Test in Cervical Cancer Screening. *American Journal of Clinical Pathology*. Abstract\*.
9. Godfroid, Edmond et al. Detection and identification of human papilloma viral DNA, types 16, 18 and 33, by a combination of polymerase chain reaction and colorimetric solid phase capture hybridisation assay. *Journal of Virological Medicine*. Vol 74, Issue 1, November 1998, pp 69-81. Abstract\*.
10. Her-Juing, Howard, et al. Reflex high-risk human papilloma virus DNA test is useful in the triage of women with atypical squamous cells cannot exclude high grade squamous intraepithelial lesion. *Diagnostic Cytopathology*. Vol 34, Issue 10, pp 707-710. 2006. Abstract\*.
11. Hesselink, Albertus T. et al. Comparison of Hybrid Capture 2 with in situ Hybridization for the Detection of High-Risk Human Papillomavirus in Liquid-Based Cervical Samples. *Cancer Cytopathology*. Vol 102, No. 1, February 25, 2004.
12. Hudelist, Gernot. Et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecologic Oncology*. 92 (2004) 873-880.
13. Ikenberg, H. et al. Semiquantitative analysis of human papillomavirus DNA in cervical intraepithelial neoplasia by a differential polymerase chain reaction. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 1997. vol 17. No. 2. 176-179.
14. Kühler, Christina, et al. Polymerase chain reaction-assisted papillomavirus detection in cervicovaginal smears: stratification by clinical cytology reports. *Virchows Archives*. 1994. 425; 157-163.
15. de Lang, Anna; et al. Significance of HPV tests on women with cervical smears showing ASCUS. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2005, Vol 84; 1001-1005.
16. Lee, G-Y, et al. Human papillomavirus (HPV) genotyping by HPV DNA chip in cervical cancer and precancerous lesions. *Int J Gynecol Cancer*. 2005. 15, 81-87.
17. Levy, Angelique W. et al. Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance in Liquid-Based Cytologic Specimens: Results of Reflex Human Papillomavirus Testing and Histologic Follow-Up in Routine Practice with comparison of Interpretive and Probabilistic Reporting Methods. *Cancer Cytopathology*. Vol 99. No. 4, August 25, 2003.
18. Lorinez, Attila T. Screening for cervical Cancer: New alternatives and research. *Salud Pública de México*. 2003. Vol 45, suplemento 3. pp s376-s387.
19. Mc Nicol, Anne and Ferquharson, Maura A. Review Article: In Situ hybridization and its diagnostic applications in pathology. *The Journal of Pathology*. Vol 182, Issue 3, pp 250-261.
20. Nasar Qureshi, M.D. et al. Role of HPV DNA testing in predicting cervical intraepithelial lesions: Comparison of HC HPV and ISH HPV. *Diagnostic Cytopathology*. Vol 29, Issue 3, pages 149-155. Abstract\*.
21. Nieminen, Pekka et al. Comparison of HPV test versus conventional and automation-assisted Pap screening as potential screening tools for preventing cervical cancer. *International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. August 2004. Vol 111, pp 842-848.
22. Ogura, Kanako, et al. Human papillomavirus localization in cervical adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma using in situ polymerase chain reaction: Review of the literature of human papillomavirus detection in these carcinomas. *Pathology International*. 2006. 56; 301-308.
23. Pilch, H. et al. The presence of HPV DNA in cervical cancer: Correlation with clinicopathologic parameters and prognostic significance: 10 years experience at the Department of Obstetrics and Gynecology of the Mainz University. *Int J Gynaecol Cancer*. 2001. 11, 39-48.
24. Pisal, Narendra et al. Triage by HPV DNA testing: is it useful in women with persistent minor smear abnormalities?. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003; 82, 575-577.
25. Seme, Katia, et al. Resolving repeatedly borderline results of Hybrid Capture " HPV DNA Test using Polymerase Chain reaction and genotyping. *Journal of Virological Methods*. Vol 134, Issues 1-2, June 2006. Pp 252-256. Abstract.
26. Shiunn, Jean et al. Correlation of human papillomavirus 16 and 18 with cervical neoplasia in histological typing and clinical stage in Taiwan: An in situ polymerase chain reaction approach. *Journal of Surgical Oncology*. Vol 78, Issue 2, pp 101-108. 2001.
27. Skydberg, Barbro et al. Human Papillomavirus Infection, Centrosome Aberration, and Genetic Stability in Cervical Lesions. *Mod Pathol*. 2001. 14 (4): 279-284.
28. Söderlund-Strand, Anna. Comparison between the Hybrid Capture II Test and PCR-Based Human Papillomavirus Detection Method for Diagnosis and Posttreatment Follow-Up of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Journal of Clinical Microbiology*. July 2005. p 3260-3266.