
PROLIFERACIÓN VIRAL. MARCADORES

Alfonso Alba Menéndez

Instituto de Estudios Celulares y Moleculares. Galicia

Desde el descubrimiento de la implicación de los Papilomavirus Humanos (VPH) en la génesis del carcinoma cervical¹ y su identificación como agente etiológico causal necesario², han transcurrido más de 25 años. La evolución en el diagnóstico de las mujeres susceptibles de desarrollar patología neoplásicas derivadas de la infección por VPH ha pasado por distintas fases, todas ellas dependientes de la introducción y disponibilidad de medios complementarios al diagnóstico clínico. Tal evolución diagnóstica no ha estado, ni está en nuestros días, exenta de problemas que tienen como origen la caracterización de subgrupos de pacientes a los que se les asignan riesgos de transformación neoplásica que derivan de la aplicación de técnicas ultrasensibles que no siempre tienen reflejo clínico y que conducen, en no pocas ocasiones, al inadecuado manejo clínico e incluso al sobretratamiento de las pacientes.

El objetivo de esta exposición es presentar de modo cronológico la introducción de técnicas complementarias y su repercusión en el manejo clínico de la paciente. Debemos tener en cuenta, como consideración básica, que el diagnóstico final de la patología cervical es exclusivamente clínico, y que deriva de la interpretación conjunta de una serie de técnicas complementarias, entre las que se incluyen la colposcopia, los resultados citológicos, los histológicos y los moleculares.

No cabe duda que la citología, introducida por Papanicolau³ en 1941, ha sido el primer marcador indirecto de patología cervical y que, a su vez y de modo indirecto, los cambios morfológicos que refleja son un marcador de la presencia de VPH y del efecto citopático provocado por la infección. Se complementaba así la observación directa del tejido a nivel colposcópico (Hinselmann 1925) o a nivel histológico (biopsia de Ruge y Veit, 1870). Tuvieron que pasar más de cuarenta años para disponer de una confirmación molecular de las observaciones de Rigoni Stern (1842) en las que postulaba la existencia de un agente transmisible en la génesis del carcinoma cervical. En 1980 Gissmann y Zur Hausen, demostraron la presencia constante del VPH en muestras de condilomas acuminados mediante el uso de la microscopía electrónica.

El descubrimiento de la técnica de PCR por Kary Mullis a finales de los 80, significó un avance extraordinario en la detección de patógenos de forma sensible y específica. Apoyados en esta técnica Keerti Shah y sus colaboradores sustituyeron las laboriosas técnicas de hibridación (in situ, inmunocitoquímica, southern blot..) por la eficiente reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y diseñaron unos

“primers consenso”, denominados MY09 y MY11, que desde entonces hasta nuestros días han sido utilizados para detectar la presencia de más de 25 tipos anogenitales de VPHs⁵. La popularización de la detección del ADN del patógeno y la caracterización de los tipos virales de alto riesgo (principalmente 16 y 18) prometía, en un primer momento, el establecimiento de subgrupos de riesgo en base al contenido viral de las tomas citológicas; Parecía intuitivo pensar que las mujeres infectadas con VPHs de alto riesgo desarrollarían la patología a medio o largo plazo de modo que podría justificarse una actitud intervencionista en este grupo de pacientes.

La escasez de medios de diagnóstico molecular a disposición de las consultas ginecológicas convencionales, hizo que estos métodos se reservasen a Centros muy especializados hasta que en 1995 comenzó la distribución del test comercial (HCI) basado en la técnica de captura de híbridos. La realización masiva de determinaciones virales poco a poco fue poniendo en evidencia que la técnica aislada resultaba en la caracterización poco específica de un amplio grupo de mujeres a las que se les informaba de su carácter de portadoras de un agente potencialmente oncogénico cuya prevalencia poblacional superaba el 6% y que se elevaba a más del 70% de las mujeres con lesiones citológicas de bajo grado⁶. El mercado creciente que suponía la realización rutinaria del test de VPH resultó en la presentación de test cada vez más sensibles (HCII, LiPA, Amplicor, etc) que lejos de solucionar el problema “clínico” lo agravaban al incluir a más mujeres en ese dudoso grupo de riesgo, dando paso al escenario en el que nos encontramos actualmente y que se presenta a continuación:

- El VPH se confirma como agente etiológico causal necesario, aunque no suficiente, para la transformación neoplásica
- Un mínimo porcentaje de mujeres que han tenido contacto con el VPH fallecerán por esta causa (<13/100.000) siendo la probabilidad de desarrollar un CIS <1,66/1000
- El test de VPH tiene unas indicaciones limitadas a la caracterización de ASCUS, en franjas de edad determinadas y control postratamiento
- En nuestro medio se sigue alterando el manejo de pacientes por un resultado molecular no aconsejado por no cumplir los criterios establecidos⁷ y que resulta, en múltiples ocasiones en tratamientos innecesarios y ansiedad para la paciente.

A la vista de estas evidencias, es fácil concluir que existen factores adicionales que hacen que un porcentaje de las mujeres que tienen contacto con el VPH se infecten de forma transitoria y que de ellas, una pequeña proporción no son capaces de resolver la infección convirtiéndose en portadoras de una infección persistente, requisito indispensable para la transformación neoplásica. A partir de aquí se abre un abanico de vías para intentar evaluar el estado de la infección en relación al huésped:

- Tipo viral presente
- Carga viral
- Integración viral
- Expresión de oncoproteínas virales
- Susceptibilidad genética del huésped y alteraciones en el ciclo celular
- Factores epigenéticos
- Factores inmunológico

Tipo viral

La utilización de los métodos de hibridación tradicionales para la detección de ADN viral solía ser “tipo específica” por requerimientos técnicos, de modo que una sonda de ADN se diseñaba de forma complementaria a la secuencia diana que se

pretendía detectar. Como consecuencia la determinación de varios tipos resultaba cara y tremendamente laboriosa. La asignación de riesgos individuales de transformación neoplásica para cada tipo viral, trajo como consecuencia que, independientemente de su prevalencia diferencial, se estableciese que ese riesgo no variaba sustancialmente para una docena de tipos virales⁸. De este modo la tendencia en el diseño de técnicas de detección fue agrupar los cócteles de sondas o degenerar los primers de PCR de modo que en una sola determinación se detectase la presencia de uno o más de los tipos de alto riesgo. La actual implantación de las vacunas VPH, probablemente requiera, de nuevo, la caracterización individual de ciertos tipos (16 y 18). Como conclusión a este punto, cabe remarcar que la disponibilidad del tipaje específico no aporta grandes diferencias respecto a la detección inespecífica de tipos de riesgo, no modifica sustancialmente el manejo de la paciente ni permite discernir subgrupos de riesgo con excepción de una tendencia asociar la infección por VPH 18 a las lesiones de tipo "adeno".

Carga viral

Haciendo un análisis de la bibliografía, referente a la carga viral, nos encontramos con afirmaciones muy dispares en lo que respecta a su valor clínico. Hay trabajos, de factura metodológica impecable, que relacionan los incrementos en la carga viral con incrementos en el grado de la lesión cervical y por el contrario, trabajos de igual calidad metodológica que demuestran la total falta de asociación. Es aquí donde debemos puntualizar las diferentes acepciones de carga viral en base a la distribución de la viremia.

Entendemos por Carga Viral Total a la que se refiere al número de partículas víricas presentes en la muestra biológica objeto del estudio. Es fácil comprender que depende directamente de cuatro factores:

- Celularidad de la toma (tipo de dispositivo utilizado y exfoliación practicada)
- Distribución superficial de la lesión
- Tasa de infección por célula
- Conservación de la muestra (degradación de ADN, presencia de inhibidores, etc)

Nos referiremos a Carga Viral Relativa cuando el valor de la carga total sea corregido en función del número de células presentes en la toma, valorado este último, en función del número de moléculas de un ADN constitutivo usado como control y necesariamente de copia única por célula. Los valores de la carga viral relativa no se verán, así, influenciados por la celularidad de la toma realizada.

Integración viral

Otro punto de controversia, respecto a la transformación neoplásica de las lesiones, es el referente a la necesidad de la integración viral para la inmortalización de las células infectadas. Si bien se ha demostrado que ciertas líneas celulares derivadas de tumores establecidos presentan integración completa del genoma vírico en el huésped, este hecho no demuestra la necesidad de tal evento para la aparición del fenotipo tumoral, sino que bien podría ser accesorio a otras características que le confieren a esas líneas celulares la consideración de clonales.

Queda bien demostrado, en apoyo a los anteriores supuestos, que existe un porcentaje de lesiones tumorales, no despreciable, en el que no se ha demostrado integración o bien coexisten las formas episomal e integrada.

Atendiendo a lo anteriormente descrito, en relación a las proteínas oncogénicas, es lógico suponer que los requerimientos últimos del proceso de transformación vienen

definidos por un bloqueo efectivo de las proteínas del ciclo celular. Este bloqueo puede ser derivado, bien de una gran cantidad de virus que expresen cantidades basales de oncoproteína o bien de una pequeña proporción de ellos que expresen altas tasas de la misma, sea a causa de procesos de integración o independiente de ellos. Como conclusión podemos afirmar que la integración viral provocará, generalmente, un estado persistente de expresión de oncoproteína, pero que este mismo estado puede darse con la conjunción de otros factores ajenos a la integración, haciendo de ésta una causa suficiente, aunque no necesaria, para conferir a las células características de transformación.

Una de las dificultades técnicas para la valoración de la integración viral radica en la necesidad de evaluar la desaparición, por escisión, del ORF viral E2. Este gen es el responsable de actuar sobre los promotores p97 y p105 que mantienen reprimida la expresión de E6 y E7. Al perderse E2, por integración en el genoma celular, no se ejerce el efecto represor con la consiguiente sobreexpresión de oncoproteínas. Dado que la PCR, método utilizado para valorar la presencia de E2, es una técnica exclusivamente cualitativa, requiere la desaparición completa de E2 en todas las células ya que de lo contrario la coexistencia de virus episomales, con regiones E2 intactas, enmascararía a las formas integradas por amplificación de las mismas.

Expresión de proteínas oncogénicas

Los estudios de expresión génica demuestran que la producción de proteínas oncogénicas E6 y E7, en aquellos casos en que el virus permanece íntegro, es decir episomal, está invariablemente conservada con independencia del tipo viral que la codifique y que se modifica únicamente en respuesta a señales moduladoras de sus promotores dependientes de la fase de la infección. De este modo, salvo discretas excepciones, la forma no integrada del virus expresa cantidades constantes de E6 y E7 una vez que la infección se hace persistente. Muy distinto es el caso en el que el DNA del VPH se encuentra integrado, ya que en esa circunstancia, la desaparición de la región E2 del HR-VPH, actúa sobre los promotores de E6 y E7 desregulándolos positivamente e incrementando la producción de RNA mensajero y la traducción de este a proteínas oncogénicas.

Susceptibilidad genética del huésped y alteraciones en el ciclo celular

Numerosos estudios han intentado relacionar la presencia de alteraciones polimórficas del ADN y mutaciones con la capacidad de transformación neoplásica mediada por los VPHs.^{9, 10, 11, 12} . El incremento en la disponibilidad de trazadores genéticos ha supuesto un gran avance en la caracterización de muchas patologías, pero también ha supuesto una oleada de información de difícil interpretación y utilidad clínica. La sucesión de eventos con base genética, que resultan de un mecanismo de transformación celular, tiene como resultado la aparición de miles de anomalías, genéticamente identificables, que si bien se asocian al proceso de transformación no son más que una consecuencia fatal de la misma y cuyo valor como marcador clínico es muy reducido y en ocasiones confusor. Entre todas estas alteraciones las más referidas a nivel bibliográfico son las que relacionan la existencia de ciertas mutaciones/polimorfismos en el codón 72 de la proteína p53 y que conferirían cierta predisposición a la transformación neoplásica. Podemos destacar también los intentos por correlacionar ciertos haplotipos de HLA a una mayor susceptibilidad al establecimiento y persistencia de la infección por VPH. Los estudios de arrays de ARN se presentan como un arma poderosa para caracterizar eventos ligados a procesos de transformación pero, necesariamente, deberán cumplir los requisitos exigidos a un marcador biológico como son la universalidad, la aparición precoz y la ausencia en procesos normales. Ciertos procesos en cascada del ciclo celular se perfilan como buenos marcadores a este efecto.

Factores epigenéticos¹³

El campo de la epigenética intenta determinar cómo afectan a la función genómica los mecanismos que regulan la manera en que los genes son procesados. Los factores epigenéticos incluyen tanto patrones espaciales, como la organización espacial del ADN alrededor de las proteínas histónicas (cromatina), como la marcación bioquímica.

Existen cientos de clases diferentes de células en nuestro cuerpo. Aunque todas las células derivan del mismo punto de partida, las características de una célula cervical son muy diferentes de las de una célula del hígado. En un genoma como el humano, con más de 30.000 genes, la importancia del silencio, como ocurre en cualquier interpretación orquestal, no debe ser subestimada. A medida que las células se desarrollan, su destino está gobernado por el uso y silenciamiento selectivo de genes. Este proceso está sujeto a los factores epigenéticos. Los patrones de metilación del ADN desempeñan un papel en todo tipo de fenómenos en los que los genes son activados o desactivados, desde la mancha de color morado en el pétalo de una petunia al crecimiento de los tumores cancerosos.

Los fallos en el silenciamiento de genes pueden producir peligrosas cacofonías. Cuando la metilación del ADN es demasiado escasa, la organización de la cromatina puede verse alterada. Esto, a su vez, afecta a qué genes son silenciados después de la división celular. Cuando, por el contrario, la metilación es excesiva, el trabajo de protección llevado a cabo por los genes supresores de tumores y los genes reparadores del ADN puede perderse. Este tipo de epimutaciones han sido observadas en una amplia variedad de cánceres incluido el cervical.

La epigenética proporciona también un medio por el que el material genético puede responder a las cambiantes condiciones ambientales. Se abre, de este modo, un nuevo campo para dar respuesta al comportamiento diferencial de las pacientes ante daños ocasionados por factores externos como es la infección por VPH.

Factores inmunológicos

Cualquier infección viral requiere de la presencia de un receptor celular que permita la internalización de las partículas virales. Esta circunstancia supone la principal barrera de entrada y explica la naturaleza especie-específica, e incluso órgano-específica, de las infecciones víricas. Algunos virus utilizan los complejos mayores de histocompatibilidad (MHCI y II), como receptor para su internalización y otros utilizan moléculas de superficie celular (CD4, receptores de quimoquinas, factores de crecimiento, β_2 -microglobulina, etc.¹⁴. Los VPHs, no tienen receptor celular específico sino una molécula de superficie muy conservada con funciones celulares vitales, lo que imposibilitaría su utilización como diana para el bloqueo de la infección. A diferencia de lo que ocurre con otros virus, no parece que los receptores de superficie estén implicados en la especificidad de tejido y especie ni en el tropismo de los VPHs.¹⁵

Tanto el reconocimiento de la infección por la célula huésped como el tropismo específico de cada subtipo viral van a determinar los efectos citopáticos en los tejidos específicos¹⁶; de este modo, se distinguen infecciones latentes que no muestran sus efectos durante largos períodos de tiempo, e infecciones activas con efectos citopáticos prácticamente inmediatos. En base a estos parámetros se puede calificar el nivel antigénico o inmunogénico de cada virus que será la base del conocimiento para la elaboración de vacunas profilácticas o terapéuticas.

INMUNIDAD CELULAR E INMUNIDAD HUMORAL FRENTE A VPH

La inmunidad celular está representada principalmente por las células T que actúan a nivel del tejido local mediante íntimo contacto célula a célula. La respuesta

humoral está mediada por las células B bajo la inducción de las células T helper mediante la producción de anticuerpos. Las células T reconocen proteínas de la superficie del VPH asociadas a moléculas de la superficie celular (HLA), mientras los anticuerpos lo hacen tanto frente a antígenos en superficie como frente a antígenos solubles, en este último caso con mayor especificidad. Los receptores de las células T reconocen secuencias específicas de pequeños péptidos presentados por el MHC, mientras que los anticuerpos reconocen estructuras estéricas, tridimensionales, con una conformación determinada. Si bien la presentación adecuada del antígeno es esencial para la inducción de la respuesta inmunológica, la cinética de la unión antígeno-anticuerpo, la cantidad del mismo y su distribución, serán los factores que determinen el grado de respuesta inmunológica.

En términos generales, tras la primera infección de las células del epitelio cervical por VPH, se desencadena una respuesta inespecífica acompañada de un proceso inflamatorio, quimioatracción de neutrófilos, activación de macrófagos, intervención de células natural killer (NK), de anticuerpos naturales, e incluso del sistema del complemento, que formarán una primera barrera defensiva de inmunidad inespecífica. La prolongación de la respuesta en el tiempo y la protección frente a futuras infecciones requiere mecanismos de inmunidad específica.

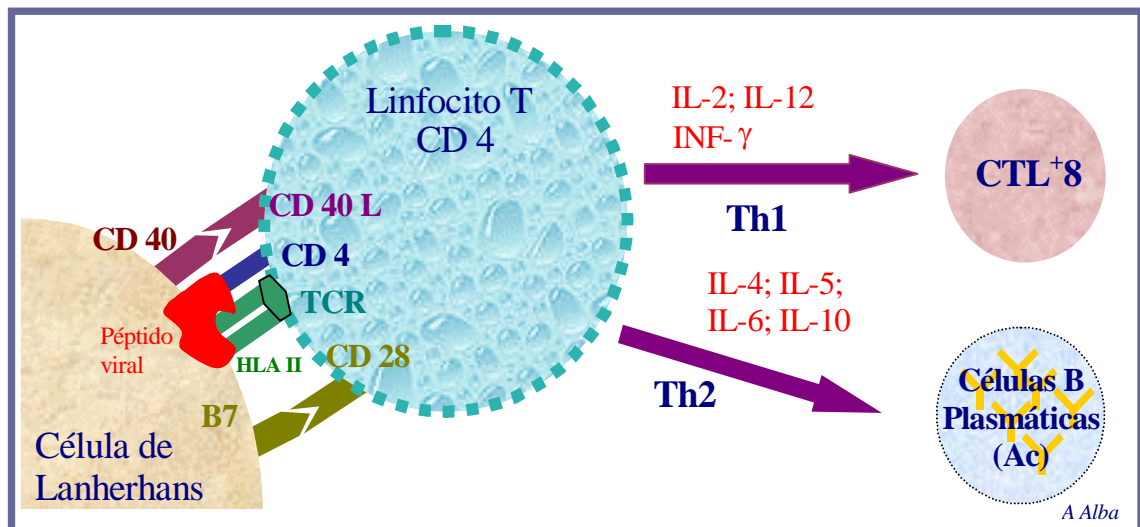


Figura 1.- La activación de los linfocitos T CD4 requiere el reconocimiento de las moléculas de superficie que expone la célula presentadora. El péptido viral junto con el HLA de clase II, será reconocido en el contexto del TCR y CD4, pero hace falta un mecanismo de "seguridad" que controle el proceso de activación, por ello, es necesario que otras moléculas como CD40 y B7, presentes en la superficie de la célula presentadora, sean reconocidas por sus receptores (respectivamente CD 40 ligando y CD28) para que la activación tenga lugar. El linfocito T CD4 activado, se convertirá en linfocito T helper de tipo 1 o de tipo2, en función de una serie de factores tisulares locales, fundamentalmente vía de entrada del

En el epitelio cervical existen células específicas con capacidad de actuar como presentadoras de antígenos y, aunque algunos queratinocitos desarrollan esta capacidad, son las células reticulares de Langerhans las verdaderas especialistas en la presentación antigénica en el epitelio cervical. Estas células fagocitan las partículas virales para digerirlas en endosomas y comenzar un proceso de activación que incluye la presentación en superficie del antígeno junto con HLA de las células presentadoras. Estas células activadas serán reconocidas por los linfocitos T CD4⁺ en el caso de que reconozcan todas y cada una de las moléculas en su entorno adecuado y, tras ello, evolucionarán hacia linfocitos helper (Th) en el

contexto local de expresión de ciertas interleuquinas (IL). Dependiendo del tipo de interleuquinas se promoverá la diferenciación hacia una vía Th1 que inducirá la activación y proliferación de los linfocitos T CD8+ citotóxicos de la inmunidad específica (CTL+8) o bien se promoverá la vía Th2 que inducirá la activación y expansión de linfocitos B que evolucionarán diferenciándose hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos frente a las proteínas virales base de la inmunidad inespecífica que podríamos identificar como profiláctica.

Los CTL+8 tendrán la capacidad de actuar frente a la infección viral establecida mientras que las células B plasmáticas producen anticuerpos que actuarán frente a los antígenos virales de origen externo que sean expuestos durante ésta y las sucesivas infecciones por VPH.

Como conclusión a todo lo expuesto, parece que incluso con la incorporación de la más moderna tecnología en la caracterización de las lesiones preneoplásicas y neoplásicas cervicales, poco hemos avanzado en lo que a caracterización de subgrupos de riesgo se refiere. Seguimos teniendo como referencia de progresión la aparición de cambios histológicos y no disponemos de medios fiables y con valor independiente para predecir que grupo de pacientes infectadas con VPHs de alto riesgo tienen una capacidad diferencial respecto al resto de progresar a carcinoma. El objetivo principal de la exposición que resume este abstract es presentar de modo comprensible el panorama de diagnóstico molecular que se ha descrito y un modelo de "diagnóstico molecular" aplicable a la clínica diaria. Realidades como la real Time PCR, los análisis de expresión de ARN y novedosas aplicaciones de técnicas conocidas como la Citometría de Flujo, que se perfilan como poderosos marcadores independientes de progresión individual.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gissmann L zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (Condylomata acuminata). Int J Cancer. 1980 May 15;25(5):605-9
2. Munoz N, Bosch X, Kaldor JM. Does human papillomavirus cause cervical cancer? The state of the epidemiological evidence. Br J Cancer. 1988 Jan;57(1):1-5. Review
3. Papanicolaou GN. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. American Journal of Obstetrics and Gynecology 42 (1941) 193-205
4. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci Am. 1990 Apr;262(4):56-61, 64-5
5. Shibata D, Fu YS, Gupta JW, Shah KV, Arnheim N, Martin WJ. Detection of human papillomavirus in normal and dysplastic tissue by the polymerase chain reaction. Lab Invest. 1988 Oct;59(4):555-9
Int J STD AIDS. 1990 Nov;1(6):410-5. Links
6. Syrjanen K, Yliskoski M, Kataja V, Hippelainen M, Syrjanen S, Saarikoski S, Ryhanen A. Prevalence of genital human papillomavirus infections in a mass-screened Finnish female population aged 20-65 years. Int J STD AIDS. 1990 Nov;1(6):410-5
7. Puig-Tintoré LM; Alba Menéndez A, Cortes Bordoy X; Bosch FX; Torné Blade A; Castellsagué X; Vidart Aragón JA; Coll Capdevila C; Vilaplana E. Documento de Consenso AEPCC, SEGO, SEC. Documentos de Consenso de la SEGO 2002.

8. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003 Feb 6;348(6):518-27
9. Wu Y, Chen Y, Li L, Cao Y, Liu Z, Liu B, Du Z, Zhang Y, Chen S, Lin Z, Xu A. Polymorphic amino acids at codons 9 and 37 of HLA-DQB1 alleles may confer susceptibility to cervical cancer among Chinese women. *Int J Cancer*. 2006 Jun 15;118(12):3006-11
10. Zoodsma M, Nolte IM, Schipper M, Oosterom E, van der Steege G, de Vries EG, Te Meerman GJ, van der Zee AG. Interleukin-10 and Fas polymorphisms and susceptibility for (pre)neoplastic cervical disease. *Int J Gynecol Cancer*. 2005 Nov-Dec;15 Suppl 3:282-90
11. Zoodsma M, Nolte IM, Schipper M, Oosterom E, van der Steege G, de Vries EG, te Meerman GJ, van der Zee AG. Analysis of the entire HLA region in susceptibility for cervical cancer: a comprehensive study. *J Med Genet*. 2005 Aug;42(8):e49
12. Ueda M, Hung YC, Terai Y, Yamaguchi H, Saito J, Nunobiki O, Noda S, Ueki M. Fas gene promoter -670 polymorphism is associated with cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol*. 2005 Jul;98(1):129-33
13. Manuel Esteller. La epigenética. Comunicación personal
14. Apple RJ, Becker TM, Wheeler CM and Erlich HA. Comparison of Human Leukocyte Antigen DR-DQ Disease Associations Found With Cervical Dysplasia and Invasive Cervical Carcinoma. *J Natl Cancer Inst*.1995. 87(6): 427-436
15. Muller M, Gissman L, Cristiano RJ, Sun XY, Frazer Ih, Jenson AE, Alonso A, Zentgraf H, Zhou J. papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. *J Virol* 1995. 69(2):948-954
16. Kadish A, Hagan RJ, Ritter DB. Biologic Characteristics of Specific Human Papillomavirus Types Predicted From Morphology of Cervical Lesions. *Human Pathology* 1992. 23(11): 1262-1269