

DETECCIÓN DE ONCOPROTEÍNAS E6/E7: UNA ALTERNATIVA PARA EL TAMIZAJE DE CÁNCER DE CÉRVIX

Mayra Massely Coico-Vega^{1,a}, Sebastián Iglesias-Osores^{1,a}, Franklin Rómulo Aguilar-Gamboa^{2,a}.

RESUMEN

Los Virus del papiloma humano (VPH), son un grupo de virus que suelen causar verrugas de poca o nula significancia clínica, sin embargo, un grupo de ellos se transmite por vía sexual y pueden causar desde verrugas genitales hasta cáncer de cérvix. Las pruebas de detección disponibles en la actualidad no pueden predecir con precisión este riesgo. Por lo tanto, existe una importante necesidad de aplicar una prueba que pueda pronosticar mejor la progresión a estos resultados. La prueba más empleada en el tamizaje para detección de infección por el VPH es el estudio citológico por Papanicolaou (PAP) y aunque es una técnica accesible y sencilla está sujeta al criterio visual del analista, lo cual afecta su especificidad y sensibilidad. Ante ello, existe una herramienta óptima no solo para el tamizaje de este virus sino para la detección de cáncer la cual se basa en la expresión de los ARNm E6/ E7 como un indicador de las infecciones por VPH que están progresando hacia cáncer. Y aunque estas pruebas moleculares son relativamente costosas, en los últimos años se han superado los obstáculos técnicos y problemas de sensibilidad para el uso de sus proteínas de expresión E6 y E7 en su forma nativa y se han generado anticuerpos monoclonales que reconocen estas oncoproteínas; lo cual permite que una técnica sencilla y accesible como el ELISA las detecte, disminuyendo así los costos y tiempo de espera e inclusive dándole la posibilidad de ser propuesta como una prueba de tamizaje.

Palabras clave: Proteínas Oncogénicas, Papillomaviridae, Neoplasias del Cuello Uterino, Ensayo de Inmunoadsorción Enzimática

DETECTION OF ONCOPROTEINS E6 / E7: AN ALTERNATIVE FOR THE SCREENING OF CERVIX CANCER

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV), a group of viruses that can cause minor warts in the clinical history, however, a group of them is transmitted sexually and can cause from genital warts to cancer of the cervix. Currently available screening tests can not predict this risk accurately. Therefore, there is an important need to apply a test that can better predict the progression to these results. The test most used in screening for HPV infection is the Papanicolaou cytological study (PAP) and although it is an accessible and simple technique, it is subject to the analyst's visual criteria, which affects its specificity and sensitivity. In view of this, there is an optimal tool not only for the screening of this virus but also for the detection of cancer that is based on the expression of the E6 / E7 mRNA as an indicator of HPV infections that are progressing towards cancer. And although these molecular tests are actually expensive, in recent years the technical obstacles and sensitivity problems have been overcome for the use of their E6 and E7 expression proteins in their native form and monoclonal antibodies have been generated that recognize these oncoproteins; which allows a simple and accessible technique such as ELISA to detect them, thus reducing costs and waiting time and even giving it the possibility of being a screening test.

Keywords: Oncogene Proteins, Human papillomavirus, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Uterine Cervical Neoplasms

¹ Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú.

² Laboratorio de Inmunología y virología, Dirección de Investigación, Hospital Regional Lambayeque. Chiclayo, Perú.

^a Biólogo- Microbiólogo

INTRODUCCIÓN

Los Papilomavirus humanos (VPH) son pequeños virus de ADN de doble cadena, icosaédricos y sin envoltura, los cuales dependen del ciclo celular del hospedero para poder replicarse. Los tipos 16, 18 y 45 del VPH están asociados con hasta el 94% de los adenocarcinomas cervicouterinos ⁽¹⁾.

La mayoría de las infecciones producidas por VPH son transitorias y no suelen tener importancia clínica. Sin embargo, las infecciones persistentes por el VPH se encuentran en 26,9% de las mujeres infectadas por el virus previamente y representan un factor de alto riesgo de progresión a cáncer de cérvix (CC) ⁽²⁾. Desafortunadamente, las pruebas de detección disponibles en la actualidad no pueden predecir con precisión el riesgo de displasia o cáncer. Por lo tanto, existe una importante necesidad de aplicar una prueba que pueda predecir mejor la progresión a estos resultados.

La prueba más empleada en el tamizaje para detección de infección por el VPH es el estudio citológico por Papanicolaou (PAP), donde se recogen las células del cuello uterino con un hisopo, las cuales son impregnadas en láminas, coloreadas y luego analizadas bajo el microscopio. Sin embargo, esta prueba es subjetiva, se basa en el examen visual y la interpretación por el citopatólogo, por lo que está sujeta a variaciones significativas entre analistas, esto último corroborado recientemente por un estudio norteamericano ⁽³⁾.

En la actualidad algunos países han incluido en el cribado de rutina a las pruebas de detección de ADN VPH-AR para aumentar la sensibilidad y el valor predictivo negativo de la prueba de Papanicolaou. Estas pruebas permiten detectar alrededor de 14 tipos de virus catalogados de alto riesgo incluyendo los VPH 16 y 18. Si bien estas pruebas pueden detectar la presencia de ADN viral, no pueden diferenciar un verdadero estado pre-canceroso de la infección autolimitada por VPH que caracteriza a la mayoría de estas infecciones. La baja especificidad de la prueba de ADN del VPH puede ocasionar el exceso de diagnóstico y el manejo ineficaz de la enfermedad. Además de las pruebas de ADN, un número de proteínas celulares del huésped, incluyendo p16, Ki67, y ProExC, también han sido identificados como biomarcadores para el diagnóstico de cáncer de cérvix. Sin embargo, se consideran marcadores indirectos y no es específico de VPH ⁽⁴⁾⁽⁵⁾.

EVOLUCIÓN Y ESTRUCTURA DEL VPH ASOCIADAS CON LA INFECCIÓN

Se ha demostrado que los Virus del Papiloma tienen una tasa evolutiva lenta, lo que sugiere que la deriva genética es principalmente responsable de la diversidad viral. De hecho, dado que los Virus del Papiloma infectan a sus huéspedes durante largos períodos de tiempo, sigue siendo una pregunta abierta qué tipos adicionales de presión evolutiva se deben experimentar para dar forma al genoma viral.

Las ganancias de las "proteínas adaptativas" impulsan la evolución del virus del papiloma. Por otro lado se sabe que los virus del papiloma codifican proteínas tempranas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y proteínas tardías L1 y L2, clasificados así de acuerdo a su expresión durante el ciclo viral. E1 y E2 son moduladores clave de replicación y transcripción, mientras que las proteínas estructurales L1 y L2 forman la cápside viral. La

mayoría de los virus también codifican proteínas (E5, E6 y E7) implicadas en la modulación del crecimiento celular y las respuestas inmunes. En los virus asociados al cáncer, se ha demostrado que estas proteínas son oncogénicas ⁽⁶⁾⁽⁷⁾.

VPH infecta preferencialmente el epitelio escamoso diferenciado y en los humanos, casi todas las partes de la piel humana pueden estar infectadas. En las últimas décadas, se ha reconocido la asociación entre VPH con cáncer de cuello uterino, pero también con un número creciente de carcinomas de células escamosas en sitios específicos. Más del 99% de los cánceres de cuello uterino contienen ADN del VPH, aunque la proporción se asocia con tipos específicos de VPH de alto riesgo ⁽⁸⁾. así mismo se ha demostrado que el análisis del ARNm identifica la presencia y la actividad de VPH de alto riesgo, siendo la expresión de los ARNm E6/ E7 un indicador no solo de las infecciones producidas por HPV sino de progresión a cáncer ⁽⁹⁾.

E6/ E7 oncoproteínas

Las proteínas E6 y E7 de alto riesgo se expresan típicamente a partir de un promotor temprano común. E6 contribuye a la transformación, al asociarse con proteínas celulares, acoplándose a motivos de péptidos denominados "LXXLL" conformados por aminoácidos específicos encontrados en estas proteínas, donde L es leucina y X es cualquier aminoácido. Las oncoproteínas E6 pueden interactuar con dianas celulares en distintas superficies celulares, pero la interacción principal es la observada con el péptido LXXLL ácido alfa helicoidal expresado como parte de una proteína diana celular ⁽¹⁰⁾. La actividad de E6 en los tipos oncogénicos contienen acciones sobre e independientes de P53.

La proteína p53 es el producto de otro gen supresor tumoral, posee como función principal la reparación del ADN dañado y la activación de la apoptosis (muerte celular programada). Por ello esta proteína es fundamental en la manutención de la integridad del genoma y destrucción de las células dañadas potencialmente tumorigénicas.

Con respecto a su acción sobre P53, E6 media su destrucción por vía proteolítica mediada por ubiquitina. Por otro lado E6 interactúa directamente con quinasas y degrada complejos proteicos "PDZ" localizados en la interfase citoesqueleto membrana que regulan el crecimiento, la polaridad y la adhesión celular ⁽⁷⁾.

La proteína E7 actúa sobre el producto del gen supresor tumoral "pRb" y sobre las proteínas asociadas p107 y p130. La proteína pRb es uno de los principales reguladores del ciclo celular, que funciona uniéndose e inhibiendo la actividad del factor de transcripción E2F. E7 se une a pRb y lo inactiva, induciendo a que la célula entre en la fase S del ciclo celular y active la replicación del ADN (hecho que es fundamental para la replicación del genoma viral del VPH). Las proteínas E7 codificadas por los virus del papiloma humano alfa asociados al cáncer tienen potentes actividades de transformación, que junto con E6, son necesarias pero no suficientes para hacer que su célula epitelial escamosa receptora sea tumorigénica ⁽¹¹⁾. Generalmente las proteínas que proceden de los subtipos 16 y 18 tienen una actividad mucha más potente de los que no lo son, en estos casos los oncogenes E6/E7 se reconocen como responsables de la iniciación y progresión a tumores invasivos ⁽¹²⁾.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS PRUEBAS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN PARA VPH.

Ante la ausencia de un método satisfactorio de cultivo viral para VPH, la detección de la infección por éste virus se confía a diversas pruebas como colposcopia, tinciones inmunocitoquímicas, microscopia electrónica de lesiones verrugosas y métodos moleculares. Siendo estos últimos en la actualidad los métodos de elección por su elevada sensibilidad (pruebas de detección del ADN de VPH) y otras por su especificidad (pruebas de detección de ARNm E6/E7).

Para seleccionar la prueba de detección adecuada de VPH, se deben considerar los resultados de ensayos clínicos, la validación clínica de la prueba y otros aspectos operacionales y de logística. En los programas de tamizaje de cáncer de cuello uterino, la detección de VPH puede realizarse mediante pruebas directas que permiten la identificación del genoma de VPH de alto riesgo, de amplificación de un fragmento de ADN viral, con o sin genotipificación, mediante la detección de ARNm. En el caso de la detección directa de ADN, éste se detecta de algunos de los 13 tipos de VPH que son considerados carcinogénicos sin realizar amplificación previa del ADN. Las segundas amplifican un fragmento del ADN viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para obtener millones de copias del mismo tanto de manera convencional como en tiempo real. Las pruebas de genotipificación permiten identificar los tipos virales de manera específica (usualmente el VPH 16 Y 18) y las ARNm identifican la expresión de los genes de las oncoproteínas E6 Y E7 del VPH(13).

Como los niveles de ADN del VPH pueden disminuir a medida que la infección progresa a cáncer, algunas pruebas de ADN del VPH pueden dar falsos negativos en más del 10% de los casos más graves de enfermedad cervicouterina(9). Así mismo, el proceso carcinogénico es regulado por las oncoproteínas E6 y E7 del VPH y, por lo tanto, la expresión excesiva de estos genes es un marcador de riesgo para cáncer de cuello uterino. En tanto se ha postulado que la detección de la expresión de oncogenes E6/ E7 podría ser más específica y predecir mejor el riesgo de cáncer que la prueba ADN-VPH. Existen al menos dos métodos que usan la detección del ARN, la prueba APTIMA de ARNm E6/E7(Gen-Probe), que detecta 13 tipos de VPH-AR y el VPH 66, y la prueba y PreTect HPV- Proofer (NorChip), que detecta el ARN de los tipos de HPV 16, 18,31,33 y 45(13).

Test de ELISA para detección de proteínas E6 Y E7 de HPV
La aprobación por la FDA de la prueba "APTIMA HPV E6 / E7 ARN" representó un hecho importante para la aplicación de las oncoproteínas virales E6 / E7 como biomarcadores específicos para la detección del cáncer de cuello uterino. Ésta técnica detecta ARNm, y a diferencia de las demás pruebas que solo brindan información sobre infección y el tipo de virus, su principal beneficio es brindar mayor valor predictivo hacia la carcinogenicidad viral, y ha demostrado tener mayor especificidad que la prueba basada en la detección de ADN(14). Sin embargo, el ARN es propenso a la degradación, y su detección requiere materiales e insumos de elevado costo y procedimientos complejos debido a ello su aplicación clínica en la práctica ginecológica de rutina es limitada.

En los últimos años se han superado los obstáculos técnicos y problemas de sensibilidad purificando las proteínas E6 y E7 de VPH recombinante en su forma nativa y se han generado anticuerpos monoclonales que reconocen estas oncoproteínas de muchos tipos de VPH-AR(4); esto permite que una técnica sencilla y accesible como el ELISA detecte estas proteínas que en un principio solo podían serlo por ensayos moleculares, disminuyendo así los costos y tiempo de espera e inclusive podría ser propuesta como una prueba de tamizaje.

Es importante remarcar que bajo el paradigma actual de Diagnóstico y detección de CC aplicado en muchos países de Latinoamérica, incluyendo al Perú, se detectan una gran población de mujeres que tienen Papanicolaou y / o VPH positivos pero que no tienen la enfermedad clínicamente significativa. Para identificar asertivamente a las mujeres que requerirán extirpación u otro tratamiento quirúrgico, los médicos normalmente se basan en pruebas repetidas y / o biopsia dirigida por colposcopia e histología. Estos no sólo son procedimientos invasivos y costosos, sino que también dependen de una interpretación subjetiva y pueden no detectar algunos cánceres debidos a errores de muestreo u otros factores. La necesidad de repeticiones en las pruebas de apoyo al diagnóstico sumado al problema de celeridad que agobia a nuestro sistema de salud, resulta en una carga tanto para los pacientes como para el sistema salud. La investigación en el desarrollo de test de Elisa para detección de E6 y E7 en hisopados cervicales representa una nueva alternativa, que aunque no está disponible en muchos países, se presenta con buenas expectativas para la detección de expresión oncogénica de VPH lo cual mejora grandemente la especificidad en la detección de CC. Esta se presenta como una alternativa simple y rentable para ejecutar que permite una mejor evaluación del riesgo lo cual puede ser clínicamente relevante, y contribuir en reducir la ansiedad del paciente y el tiempo perdido, la repetición innecesaria de pruebas, el uso de invasiva colposcopia / biopsia, y reducir los costos relacionados en el sistema de salud.

CONCLUSIÓN

Por lo expuesto, recomendamos investigar otras alternativas para el tamizaje de cáncer de cérvix, debido a que las técnicas disponibles en la actualidad se caracterizan por ser invasivas relativamente costosas, y de interpretación subjetiva como en el caso del PAP. El desarrollo de líneas de investigación orientadas al diseño y perfección de Test de ELISA para la detección de proteínas E6 y E7, tendría como ventaja identificar la presencia y la actividad de una infección por el HPV de alto riesgo; Mientras que la expresión de los ARNm E6/ E7 se utilizaría como un indicador de las infecciones por el VPH que son más probables en causar enfermedad. Y aunque la prueba de detección de ARNm, ha demostrado la misma excelente sensibilidad que tienen las pruebas de ADN, minimizando así los falsos negativos. El diseño de kits diagnósticos para detección por ELISA no solo ofrece un mayor nivel de detección para un mejor tratamiento de los pacientes positivos para el HPV sino la posibilidad de tener una prueba de tamizaje que no detecte el virus sino la presencia de oncogenes y mejore la interpretación ante un caso sospechoso de cc.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sanabria Negrín JG. Revista de ciencias médicas de Pinar del Río. [Internet]. Vol. 13, Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río. 1999, Editorial Ciencias Médicas; 2009 [cited 2018 Apr 1]. 168-187 p. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-31942009000400019
2. Nielsen A, Kjaer SK, Munk C, Osler M, Iftner T. Persistence of high-risk human papillomavirus infection in a population-based cohort of Danish women. *J Med Virol* [Internet]. 2010 Apr [cited 2017 Jan 30];82(4):616–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20166190>
3. Crothers BA, Booth CN, Darragh TM, Zhao C, Souers RJ, Thomas N, et al. False-Positive papanicolaou (pap) test rates in the college of american pathologists pap education and pap proficiency test programs : Evaluation of False-Positive responses of high-grade squamous intraepithelial lesion or cancer to a negative reference d. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(5):613–9.
4. Yang Y-S, Smith-McCune K, Darragh TM, Lai Y, Lin J-H, Chang T-C, et al. Direct human papillomavirus E6 whole-cell enzyme-linked immunosorbent assay for objective measurement of E6 oncoproteins in cytology samples. *Clin Vaccine Immunol* [Internet]. 2012 Sep [cited 2017 Jan 14];19(9):1474–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22815148>
5. Lim S, Lee MJ, Cho I, Hong R, Lim SC. Efficacy of p16 and Ki-67 immunostaining in the detection of squamous intraepithelial lesions in a high-risk HPV group. *Oncol Lett*. 2016;11(2):1447–52.
6. Van Doorslaer K. Evolution of the Papillomaviridae. *Virology* [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2018 Apr 1];445(1–2):11–20. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682213002924>
7. Carlos Fernando Grillo-Ardila, Mercy Yolima Martínez-Velásquez BM-L. Virus del papiloma humano: aspectos moleculares y cáncer de cérvix. *Rev Colomb Obstet Ginecol* [Internet]. 2008 [cited 2018 Mar 30];59(4):310–5. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74342008000400007
8. Cubie HA. Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology* [Internet]. 2013 Oct [cited 2018 Apr 1];445(1–2):21–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23932731>
9. Hologic. Con la prueba de HPV de Aptima® basada en ARNm, el resultado viene directamente del mensajero. [Internet]. 2015 [cited 2018 Apr 1]. Available from: http://www.hologic.es/files/aptima-hpv/PB-00221-IBR-ES_001_01.pdf
10. Vande Pol SB, Klingelutz AJ. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology* [Internet]. 2013 Oct [cited 2018 Apr 1];445(1–2):115–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23711382>
11. Roman A, Munger K. The papillomavirus E7 proteins. *Virology* [Internet]. 2013 Oct [cited 2018 Apr 1];445(1–2):138–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23731972>
12. Varela Lema L, Queiro Verdes T. Detección de los oncogenes HPV E6/E7 para el diagnóstico precoz de cáncer de cuello de útero. *santiago de compostela*; 2010.
13. Organización Mundial de la Salud (OMS), CDC, OPS. Incorporación de la prueba del virus del papiloma humano en programas de prevención de cáncer cervicouterino. 2016. 67-10,13 p.
14. Castle PE, Eaton B, Reid J, Getman D, Dockter J. Comparison of human papillomavirus detection by Aptima HPV and cobas HPV tests in a population of women referred for colposcopy following detection of atypical squamous cells of undetermined significance by Pap cytology. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2015 Apr [cited 2017 Jan 30];53(4):1277–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25653409>