

La prueba de ARNm E6/E7 para la enfermedad intraepitelial cervical de alto grado inducida por el Virus del Papiloma Humano: una perspectiva alentadora

Massimo Origoni^a, Paolo Cristoforoni^b, Guia Carminati^a, Chiara Stefani^a, Silvano Costa^c, Maria Teresa Sandri^d, Luciano Mariani^e, Mario Preti^f

^a Departamento de Ginecología y Obstetricia, Universidad Vita Salute San Raffaele , Facultad de Medicina – Milán, Italia

^b Polo Oncológico Villa Montallegro – Génova, Italia

^c M.F. Hospital Toniolo – Bologna, Italia

^d División de Laboratorio Médico, Instituto Europeo de Oncología - Milán, Italia

^e UNIDAD VPH, Instituto Nacional del Cáncer "Regina Elena" – Roma, Italia

^d División de Laboratorio Médico, Instituto Europeo de Oncología - Milán, Italia

Autor para la correspondencia

Dr. Massimo Origoni

Department of Gynecology & Obstetrics, Vita Salute San Raffaele University, School of Medicine
IRCCS Ospedale San Raffaele, Via Olgettina 60 – 20132 Milano, Italy

Teléfono: +39.(0)2.2643.2579

Fax +39.(0)2.2643.2759

Email: massimo.origoni@hsr.it

Palabras clave: Virus del papiloma humano, VPH, E6, E7, ARNm, cáncer cervical, ADN del VPH

Resumen

Desde la introducción de las pruebas biomoleculares para la identificación del ADN de los virus del papiloma humano de alto riesgo (ADN VPHar) en las estrategias de prevención del cáncer cervical, han surgido muchos aspectos interesantes en este campo. En primer lugar, las pruebas de ADN del VPH han demostrado mejor sensibilidad que la citología convencional en muchos escenarios: detección, triaje de ASC-US y en el seguimiento post-tratamiento. A pesar de ello, también se han subrayado ciertas limitaciones en estas nuevas tecnologías: el problema principal es la baja especificidad de las pruebas, que no pueden discriminar entre infecciones regresivas y progresivas. Por lo tanto, estudios recientes han dirigido su atención hacia nuevos marcadores de la progresión que pudieran detectar de manera más precisa aquellos casos con un riesgo real de desarrollo de cáncer. Dado que la progresión hacia el cáncer depende de la acción de integración y transformación de las proteínas E6/E7, se considera que las actividades de transcripción que conducen a la sobreexpresión de E6 y E7 constituyen un valioso marcador de dicho riesgo. Este análisis tiene por objetivo resumir la bibliografía sobre este tema y ofrecer una visión clara de los puntos de vista emergentes.

Antecedentes

En los últimos cuarenta años y con el objeto de disminuir la morbilidad y mortalidad ocasionada por el cáncer cervical, la mayoría de los países desarrollados han introducido programas de detección de cáncer cervical que se basan en la examinación citológica de frotis vaginales (test del Papanicolaou). Sin embargo, la citología cervical no ha demostrado tener sensibilidad óptima, y recientemente los avances en el conocimiento de la historia natural de la enfermedad han sugerido estrategias alternativas. La infección persistente por genotipos del virus del papiloma humano de alto riesgo (VPHar) ha sido reconocida como causa necesaria de cáncer cervical (1). Lo

que inicialmente llevó a la adopción de pruebas moleculares para la evaluación de la presencia de ADN de VPHar para el triaje de frotis de Papanicolaou con anomalías mínimas. Más recientemente, se ha acumulado evidencia que implica que puede lograrse una mejoría significativa en la efectividad de la detección del cáncer cervical mediante el uso de pruebas de ADN-VPHar como herramienta primaria de detección. De hecho, las pruebas de ADN-VPHar tienen mejor sensibilidad para lesiones cervicales con relevancia clínica (neoplasia intraepitelial cervical 2 o peor, NIC2+) que la citología. Además, las pruebas moleculares han demostrado ofrecer mejor protección contra las NIC de alto grado y el cáncer que la citología en rondas de detección posteriores, permitiendo prolongar los intervalos entre chequeos con implicaciones logísticas y económicas favorables. Sin embargo, las infecciones por VPHar son bastante comunes en la población general y la mayoría de ellas son transitorias, con regresión espontánea en un período de 18 a 24 meses. De hecho, el valor predictivo positivo (VPP) de una prueba positiva de ADN-VPHar es bastante bajo (es decir, sólo una pequeña proporción de aquellas mujeres con resultados positivos para ADN de VPH de alto riesgo tendrán lesiones NIC2+ al momento en que se hace la prueba o la desarrollarán en los próximos años), y hasta 10% de la población examinada obtiene resultados positivos y por lo tanto necesitarán alguna forma de triaje de segundo nivel. El esfuerzo de las investigaciones se ha enfocado entonces en métodos de evaluación suplementarios o posibles alternativas que puedan limitar los procedimientos de seguimiento innecesarios para aquellas mujeres con infecciones por VPHar sin relevancia clínica o temporales. Hasta ahora, la mayoría de las directrices nacionales sobre la prevención del cáncer cervical consideran la citología reflejo (es decir, la lectura de una muestra citológica recolectada durante una prueba primaria de ADN de VPH pero almacenada y no evaluada inicialmente) como herramienta de triaje de valor para mujeres ADN-VPHar positivas. Sin embargo, hasta 8% de las mujeres VPHar positivas con citologías normales tienen o desarrollarán en unos pocos años una lesión NIC2+, y el conocimiento

previo del estatus ADN-VPH podría influenciar la lectura subjetiva de la citología. Por lo tanto, existe una gran necesidad de biomarcadores que permitan la estratificación del riesgo para mujeres VPH positivas con citologías normales, o de lo contrario, capaces de reemplazar la citología como herramienta de triaje. Teniendo en cuenta que la progresión hacia la malignidad cervical requiere de una sobreexpresión de los genes E6 y E7 de los genomas integrados de VPHar, la demostración de transcripciones de E6/E7 de VPHar en muestras cervicales podría ser más específica para la detección de lesiones NIC2+ que el uso de tan solo pruebas de ADN-VPHar. En la actualidad es posible realizar un análisis de la transcripción en los hisopados cervicales debido a que la introducción de la citología de base líquida ha resultado en medios de colección que permiten preservar el ARN lo suficientemente como para permitir la amplificación y detección *in vitro*.

Detección de ARNm de las E6/E7 de HPVar

En la actualidad existen tres pruebas comerciales para la detección de ARN mensajero (ARNm) de las E6/E7 de VPHar. El PreTect HPV-Proofer (NorChip AS, Klokkarstua, Noruega) y el NucliSENS Easy Q HPV (bioMérieux) se basan en la misma tecnología, pero son producidos por distintas compañías, con pequeñas diferencias en el protocolo de extracción del ARNm y el análisis de la información (2). Estas pruebas se basan en la amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA). El ensayo es una amplificación isotérmica del ARN en tiempo real que detecta el ARNm de las E6/E7 y realiza una genotipificación de los cinco tipos de VPHar más oncogénicos (16,18,31,33 and 45) (3). La amplificación NASBA se basa en la extensión y transcripción de cebadores mediante actividades coordinadas de tres enzimas (RNasa H, transcriptasa reversa y ARN-polimerasa). La reacción de amplificación es isotérmica y se lleva a cabo a 41°C. Debido a la temperatura relativamente baja, no se puede amplificar el ADN contaminado. La detección en tiempo real mediante el uso de balizas moleculares se basa en la medición de la detección

dependiente del tiempo del aumento de la señal fluorescente. Dicha señal es producida solo luego de la unión específica de la baliza molecular con un amplicón (ARNm de VPH específico) (Figura 1). La medición se hace en combinación con el paso de amplificación (tiempo real) (4). Ambas pruebas recibieron la marca CE-IVD. (Figura 1) El ensayo APTIMA VPH (Hologic, San Diego, CA) es una prueba de amplificación de ácidos nucleicos que tiene por objetivo la detección cualitativa del ARNm viral de las E6/E7 de 14 VPHar (16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/ 66/68). El ensayo involucra tres eventos principales en un solo tubo: captura del blanco, amplificación del blanco por amplificación mediada por transcripción (TMA) y detección de los productos de amplificación. La TMA es un método de amplificación de ácido nucleico basado en transcripción que involucra dos enzimas, la transcriptasa reversa y la ARN-polimerasa (Figura 2). La transcriptasa reversa es utilizada para generar una copia del ADN de la secuencia blanco de ARNm que contiene una secuencia promotora para la ARN-polimerasa. La ARN-polimerasa genera copias múltiples del amplicón ARN a partir del modelo de la copia de ADN (5). Los amplicones se detectan por ensayo de protección de hibridación (HPA) mediante el uso de sondas de ácido nucleico de hebra simple con etiquetas de quimioluminiscencia las cuales son específicamente complementarias a los amplicones blanco. El reactivo de selección distingue entre sondas hibridizadas y no hibridizadas al inactivar la etiqueta en las sondas no hibridizadas. Durante el paso de detección, se mide la luz emitida por los híbridos etiquetados ARN:ADN en un luminómetro como señales de fotones, lo que luego se reporta como Unidades de Luz Relativas (RLU) (6). En ensayo APTIMA también podría llevar a cabo una genotipificación del VPH 16 por separado y 18-45 en conjunto, pero requiere de ensayos separados APTIMA 16 y 18/45. El ensayo APTIMA VPH es una prueba que cuenta con aprobación CE-IVD y de la FDA.

A la vanguardia

En el año 2009 un grupo de investigadores de la Universidad Católica en Roma publicaron sus hallazgos en 180 mujeres evaluadas histológica y colposcópicamente con el fin de estudiar la presencia de ADN-VPH (HC II) y ARNm (NucliSENSE) (7). Tal como se esperaba, las mujeres que resultaron positivas para las transcripciones de ARNm fueron menos que las para el ADN-VPHar, y hubo una correlación bastante buena entre el grado de positividad y la severidad de la lesión. Se encontró ADN de VPHar en 57.8% de los especímenes; y transcripción de E6 y E7 en 45% de ellos. Los índices de detección del ADN-VPH y de la transcripción de E6 y E7 fueron del 33.3% y 25% respectivamente para especímenes con hallazgos normales; 51.4% y 31.9% respectivamente para especímenes con neoplasia intraepitelial cervical grado 1 (NIC1); y 61.1% y 44.2% para especímenes con NIC2, respectivamente. Todos los especímenes con NIC3 y 95.5% de los especímenes de pacientes con carcinoma de células escamosas fueron positivos en ambos ensayos. En general, las pruebas de ARNm demostraron mejor especificidad que las pruebas de ADN para las lesiones de alto grado (72.7% y 56.2% respectivamente) y un valor predictivo positivo más alto (59.3% y 49.0% respectivamente). Los autores sugirieron que los ensayos de ARNm podrían ser más poderosos que las pruebas del ADN a la hora de predecir el riesgo de progresión y ofrecer una sólida herramienta potencial para el triaje y seguimiento de las pacientes. En el año 2011, Burger de Noruega realizó un análisis sistemático para determinar el rendimiento de las pruebas de ARNm de VPH en comparación con las pruebas de ADN utilizando las NIC2+ como condición objetivo (2). El estándar de referencia utilizado para diagnosticar lesiones precancerosas fue la confirmación histológica de neoplasia intraepitelial cervical 2+ (NIC2+). Para cada estudio se evaluaron sensibilidad, especificidad, índices probables de positividad y negatividad e índices probables de diagnóstico. Los estudios incluidos (11 de 3271 publicaciones) tenían distintas calidades de metodología y habían sido realizados predominantemente en un escenario de detección secundario. Ocho estudios investigaron el rendimiento de PreTect HPV-

Proofer/NucliSENS EasyQ, dos estudios investigaron el rendimiento del ensayo APTIMA y un estudio investigó ambas pruebas de ARNm en muestras de una misma paciente (Tabla 1). Debido a la escasez de estudios y la considerable heterogeneidad clínica, no fue posible agrupar la información. Sin embargo, los autores recopilaron una "síntesis de la mejor evidencia" para las pruebas de ARNm de las E6/E7 de VPH. Las sensibilidades variaron de 0.41 a 0.86 y de 0.90 a 0.95 para el PreTect HPV-Proofer/Easy Q y el ensayo APTIMA respectivamente. Las especificidades variaron de 0.63 a 0.97 y de 0.42 a 0.61 para el PreTect HPV-Proofer/Easy Q y el ensayo APTIMA respectivamente. Las curvas SROC para ambas pruebas ARNm fueron hacia la izquierda de la diagonal y el rendimiento del ensayo APTIMA fue más cercano al de las pruebas de ADN. Los autores concluyeron que las pruebas de ARNm tienen relevancia diagnóstica, pero es necesario llevar a cabo estudios y análisis económicos adicionales para poder llegar a una conclusión firme en cuanto a la aplicabilidad clínica de las pruebas de ARNm de VPH. En el año 2012, Monsonego publicó los resultados de un Estudio FASE (Estudio de Evaluación Francés de la Investigación de APTIMA), un estudio multicentro de 5000 mujeres francesas diseñado para evaluar el rendimiento del ensayo APTIMA VPH (AHPV), Hybrid Capture 2 (HC2), genotipificación interna basada en la PCR, y ThinPrep LBC en pruebas de detección basadas en la población (8). El AHPV tuvo el riesgo absoluto más alto para ambos extremos histológicos, detectando 5% a 15% más lesiones NIC3+ y NIC2+ respectivamente, que el LBC. En comparación con el ensayo HC2, el riesgo relativo de la positividad del AHPV fue 24% a 29% más alto, con una diferencia significativa en la detección de NIC2+. Teniendo el LBC como referencia, el AHPV tuvo el mejor balance sensibilidad/especificidad medido en AUC (área bajo la curva ROC) en el test comparativo (significativo para las NIC2+), y el índice de derivación a colposcopia (9.2%) en comparación con el del LBC (8.7%). Los datos del estudio FASE corroboraron la aptitud del AHPV en la detección primaria de cáncer cervical. Varios estudios investigaron el ensayo PreTect HPV-Proofer en biopsias y muestras de raspado cervical y

mostraron que la relación de positividad del ARNm de las E6/E7 de VPHar - positividad del ADN-VPHar aumentaba con la severidad histológica de la displasia. Esto sugiere una mayor especificidad de este ensayo ARNm para las lesiones cervicales de alto grado en comparación con las pruebas de ADN-VPH (9). En un estudio reciente llevado a cabo por Rijkaart (10), 375 de 13401 mujeres participantes en un programa de detección de cáncer cervical basado en la población de los Países Bajos fueron estratificadas para riesgo de NIC2+ de acuerdo a su estatus ARNm de las E6/E7 de VPHar. Las poblaciones estudiadas incluyeron 202 mujeres con citología normal, 88 con citología fronteriza o discariosis leve (BMD) y 85 con discariosis moderada o peor (>BMD). Todas las mujeres resultaron positivas para ADN-VPHar en el ensayo GP5+/6+ PCR utilizado en el programa de detección. Un resultado positivo de la prueba ARNm confería un riesgo mayor de NIC2+ en mujeres ADN-VPHar positivas con citología normal (0.55, 95% intervalo de confianza, 0.34 a 0.76) en comparación con 0.20 (95% intervalo de confianza, 0.07 a 0.33) en mujeres ARNm negativas. En aquellas mujeres ADN-VPHar positivas con BMD o >BMD, el resultado de la prueba de ARNm no tenía influencia alguna en el riesgo de NIC2+. Por lo tanto, los autores concluyeron que las pruebas de ARNm con el PreTect HPV-Proofer podrían ser de valor para seleccionar mujeres ADN-VPHar positivas con citología normal en mayor riesgo, y que por lo tanto requieren de una derivación inmediata a colposcopia. Un estudio bastante reciente de Corea evaluó un kit comercial de diagnóstico dirigido al ARNm de las E6/E7 de HPV basado en un ensayo RT-qPCR en una serie de 337 muestras ThinPrep y reportó 91% de sensibilidad y 98.6% de especificidad para lesiones cervicales NIC2+ (11). Los índices generales positivos del ensayo ARNm de las E6/E7 de VPH RT-qPCR fueron del 100% (24/24), 86% (38/44), 100% (7/7), 37% (10/27), 15% (5/32), y 1% (3/203) en SCC, HSIL, ASC-H, LSIL, ASC-US, y muestras normales, respectivamente. El kit evaluado demostró una sensibilidad marcadamente superior (91 contra 41%) cuando se le comparaba con el ensayo NASBA en tiempo real, que era el estándar de referencia en el estudio. El ensayo

evaluado demostró también mejor correlación entre el índice de positividad y severidad de la lesión citológica, y enfatizó la posible relevancia de los ensayos de detección de ARNm en el manejo clínico de las mujeres examinadas para la detección de precursores del cáncer cervical. Sin embargo, en la sección de discusión, los autores resaltaron que el bajo desempeño del ensayo NASBA podría haber estado relacionado con una serie de limitaciones técnicas debido al método adoptado de extracción y amplificación del ARN, e insistieron en la importancia de estudios de mayor envergadura para evaluar una población de pacientes más representativa y la importancia de la consideración de diferencias geográficas, debido al predominio de genotipos de VPH variables en especímenes de cáncer cervical. En resumen, el desempeño en términos de sensibilidad/especificidad de los 5 ensayos ARNm de VPHar (PreTect HPV-Proofer y NucliSENS EasyQ HPV) no puede ser agrupado con la prueba APTIMA para los 14 ARNm de VPHar. La prueba APTIMA es más similar a la prueba de ADN del VPH como Hybrid Capture 2 en cuanto a sensibilidad y especificidad, mientras que las cinco pruebas de genotipos de ARNm de las E6/E7 de VPH tienen mucha mayor especificidad que el ensayo APTIMA (12,13)

Pruebas de ARNm de VPH en el triaje para LSIL

Las pruebas de ADN del VPH tienen baja especificidad y un alto índice de positividad en las LSIL, lo que hace que la prueba de ADN del VPH no sea particularmente útil en el triaje de LSIL. La prueba APTIMA de 14 genotipos y en particular las pruebas de cinco genotipos ARNm de las E6/E7 de VPH tienen mayor especificidad y un índice de positividad bajo en las LSIL. Un índice de positividad bajo se traduce en un índice bajo de derivaciones a colposcopia, lo que es deseable en las situaciones de triaje (13-16). Aquellas mujeres con lesiones cervicales leves tienen un riesgo pequeño pero significativamente mayor de desarrollar cáncer cervical en comparación con aquellas mujeres con frotis normales. El propósito del triaje es identificar aquellas mujeres que necesitan seguimiento con colposcopia y biopsia para detectar displasia cervical de alto grado o cáncer (NIC2+). En casos

de células escamosas atípicas de significación indeterminada (ASC-US), ahora se reconoce ampliamente que el triaje con la prueba de ADN del VPH es más sensible, pero menos específica que la repetición de una citología (17, 18). Sin embargo, para aquellas lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL) las recomendaciones en cuanto al mejor método para el triaje son contradictorias y varían entre la repetición de citologías, pruebas de VPH o una derivación directa a colposcopia (19, 20). Los meta-análisis indican que el triaje de las LSIL con pruebas de ADN de VPH de alto riesgo no es más sensible y es sustancialmente menos específico que la repetición de la citología (15, 16). En algunos estudios, se ha sugerido el triaje basado en VPH de LSIL en mujeres de más de 30-35 años de edad (21, 22), pero otros estudios no lo han confirmado (23, 24). Por lo tanto, se ha llegado a la conclusión de que la investigación sobre la mejor estrategia para el triaje de lesiones LSIL es prioritaria. En un estudio en Noruega de 522 mujeres con LSIL, 207 tenían biopsias y 125 de ellas tenían NIC2+. La sensibilidad y la especificidad de las citologías repetidas (ASC-US o peor) fueron del 85.7% (95% intervalo de confianza (CI): 72.1, 92.2) y 54.4 % (95% intervalo de confianza: 46.9, 61.9), respectivamente. La sensibilidad y especificidad de la prueba de ARNm de VPH fue del 94.2% (95% intervalo de confianza: 88.7, 99.7) y 86.0% (95% intervalo de confianza: 81.5, 90.5), respectivamente. El VPP de las citologías repetidas fue de 38.4% (95% intervalo de confianza: 29.9, 46.9) comparado con 67.0% (95% intervalo de confianza: 57.7, 76.4) de la prueba de ARNm de VPH. En conclusión, la prueba de cinco genotipos ARNm de las E6/E7 de VPH fue más sensible y específica que la citología repetida en el triaje de mujeres con citología LSIL. Además, la prueba ARNm de VPH mostró un VPP más alto. Estos datos indican que la prueba de ARNm de VPH es una mejor prueba para el triaje de mujeres con LSIL que las citologías repetidas (15, 16). En un meta-análisis por Arbyn, la sensibilidad y la especificidad grupal de APTIMA para el triaje de LSIL fue de 96.7% (95% intervalo de confianza= 91.4-98.9%) y 38.7% (95% intervalo de confianza= 30.5-47.6%) para NIC3+. APTIMA fue tan sensible como HC2 pero más

específico (índice: 1.35; 95% intervalo de confianza= 1.11-1.66). En ambos triajes de ASC-US y LSIL, APTIMA es tan sensible pero más específico que HC2 para la detección del precáncer cervical (14). En el seguimiento de pacientes con colposcopia negativa/histología cervical negativa, las pruebas de cinco genotipos de ARNm de las E6/E7 de VPH tienen mayor especificidad y un VPP más alto para las NIC2+ que las citologías repetidas, sugiriendo un abordaje "examen y tratamiento" para las pruebas ARNm de VPH en mujeres de más de 40 años (26). En los estudios clínicos, la histología se usa como el estándar por excelencia para la detección de NIC2+. Desafortunadamente, la colposcopia no tiene una sensibilidad óptima para las NIC2+. Las directrices del Programa de Detección de Cáncer Cervical del Servicio Nacional de Salud (NHSCSP) para Colposcopias y Manejo de Programas, que rige las prácticas en Gran Bretaña, requiere de una evidencia en la precisión de las colposcopias del 65% (27). Zuchna reportó una sensibilidad del 66.2% de las NIC2+ cuando hasta tres biopsias cervicales dirigidas se tomaban como prueba diagnóstica con la biopsia en cono como estándar de referencia (28). Mediante el uso de imágenes cervicales digitalizadas de 919 mujeres referidas por anomalías citológicas equívocas o leves en el estudio de triaje ASCUS-LSIL, Massad reportó un 39% de positividad para las NIC2+ (29). Por lo tanto, todas aquellas mujeres con colposcopia y biopsias negativas luego de una citología anormal y/o pruebas de VPH tienen que recibir seguimiento.

Las pruebas de ARNm de VPH en el seguimiento y post-tratamiento conservativo para lesiones NIC2/Nic3

Se considera que aquellas mujeres que recibieron tratamiento conservativo para lesiones NIC 2-3 tienen un alto riesgo de desarrollo de carcinoma invasivo por muchos años y que por lo tanto requieren de monitoreo continuo. En especial, entre 5% y 20% de las mujeres tratadas por NIC2+ desarrollarán enfermedad recurrente dentro de los 3 años (30). Por este motivo, un seguimiento adecuado resulta obligatorio. En la actualidad, a pesar de que se percibe la baja sensibilidad, el

test del Papanicolaou es utilizado en el seguimiento de pacientes tratados por neoplasia intraepitelial y las directrices europeas para las políticas de detección de cáncer cervical recomiendan citologías a los 6, 12 y 24 meses luego del tratamiento de la NIC (31, 32). Estudios observacionales han demostrado que las pruebas de ADN del VPH tienen una eficacia significativamente mayor que la citología en la predicción de enfermedad persistente o recidiva y por consiguiente la detección de infección persistente por los genotipos de VPHar puede mejorar el manejo de pacientes. En realidad, las pruebas de ADN-VPHar son mucho más sensibles (90%) que la citología de seguimiento (70%) (33,34) y en la actualidad la ASCCP recomienda el uso de pruebas de ADN del VPH con citología (pruebas combinadas) a los 12 y 24 meses luego del tratamiento por NIC2/3 (35). En realidad, la erradicación de la lesión clínica no necesariamente implica erradicación de todo el tejido infectado y hasta un 40% de las mujeres tratadas todavía continúan siendo VPHar positivas debido a que las pruebas de ADN-VPHar no distinguen entre infección transitoria nueva e infección persistente (36, 37). Este es el motivo por el cual las pruebas de ADN-VPHar tienen menor especificidad que la citología para la identificación de la enfermedad recurrente o persistente. Estudios prospectivos recientes documentaron que los índices de enfermedad residual o recurrente en mujeres con VPHar 16 y/o 18 persistentes son más altos que en mujeres con otros tipos de VPHar, recalando la importancia de la determinación genotípica de tipos específicos luego del tratamiento de las NIC2+ (38-40). Debido a que los ensayos de genotipo de VPHar se han utilizado cada vez más en la práctica clínica, será necesario investigar más para determinar si los resultados por tipo específico de VPH pueden mejorar la identificación de mujeres con posibilidades de mayor riesgo de desarrollar enfermedad cervical luego del tratamiento. Un análisis sistemático reciente recalca que las infecciones nuevas por VPH son una fuente potencial para el riesgo de enfermedad futura luego de un tratamiento de cáncer y precáncer cervical (41). Más recientemente se ha sugerido que la actividad oncogénica de las

transcripciones de ARNm-ar (42) puede ser un mejor indicador de las mujeres en riesgo de persistencia o recidiva de la enfermedad, mostrando una especificidad más alta que los ensayos basados en el ADN, con mejor especificidad y valor predictivo negativo (VPN) que las pruebas de ADN-VPHar (43), mientras que otros subrayan que el ARNm de las E6/E7 del VPH no es útil en la detección de la recidiva (2). Para poder evaluar el desempeño de las distintas pruebas biomoleculares, solas o en combinación con la citología, se está llevando a cabo un estudio prospectivo en Italia para evaluar la predicción del índice de persistencia/recurrencia en mujeres tratadas por NIC2+. Los resultados preliminares parecen indicar que la combinación de pruebas de Papanicolaou + ARNm de las E6/E7 de VPH muestra la mejor especificidad mientras que la genotipificación de VPHar retiene la predicción más alta para la enfermedad persistente o recurrente de NIC2+.

Conclusión

En general, las pruebas de ARNm de las E6/E7 de VPH han demostrado en varios estudios publicados que tienen las características de una herramienta de diagnóstico precisa en el campo de la prevención del cáncer cervical (44). Por este motivo, la evidencia actual sugiere que las pruebas de ARNm pueden considerarse como posibilidades alentadoras en términos de la implementación de la precisión diagnóstica de las lesiones cervicales preneoplásicas en distintos escenarios (45-50), incluidas las lesiones glandulares y el adenocarcinoma (51). La detección primaria ha sido por supuesto más ampliamente investigada, y representa la opción de aplicación más interesante en vista de los cambios recientes a nivel mundial de la citología hacia programas de detección moleculares, que se basan en evidencia. En comparación con las pruebas ADN-VPHar, que en realidad representan la alternativa más válida a la citología en el marco de las pruebas de detección, las pruebas de ARNm presentan una mejoría valiosa de una mejor especificidad y por consiguiente, un valor predictivo positivo (VPP) mayor hacia las lesiones cervicales de alto grado

(NIC2+) (52). En términos de pruebas de cura luego del tratamiento, a pesar de la limitación significativa de una falta de ensayos controlados de envergadura, los datos preliminares interesantes indican la posible integración de las pruebas de ARNm con la citología. Las pruebas de ARNm de las E6/E7 de VPH pueden utilizarse como discriminadores más específicos entre displasia cervical transitoria y lesiones potencialmente progresivas. En consecuencia, las pruebas de las E6/E7 de VPH de alto riesgo podrían reducir la carga psicológica asociada con las pruebas de ADN del VPH (53).

En conclusión, desde el comienzo de la era molecular en la prevención del cáncer cervical, se han dado muchos pasos hacia adelante solo para superar las limitaciones de la citología. Las pruebas de ARNm representan en realidad un nuevo desafío, con una posibilidad alentadora de que puedan ser integradas a un grupo de valiosas herramientas moleculares que esperamos conduzcan en el futuro cercano a la eliminación del cáncer cervical en mujeres.

Reconocimientos

Los autores desean reconocer a Mario Sideri, por su orientación y apoyo en este trabajo y en toda la actividad del Grupo de Estudio del VPH en Italia (IHSG). Mario fue uno de nuestros colegas más inteligentes y visionarios y hemos tenido la dicha de su amistad. En su memoria, el "grupo de estudio del VPH en Italia Mario Sideri IHSG" se compromete a continuar con su investigación y con sus iniciativas para la enseñanza.

Referencias

1. Tommasino M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 2014;26:13-21.
2. Burger EA, Kornor H, Klemp M, Lauvrak V, Kristiansen IS. HPV mRNA tests for the detection of cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. *Gynecologic Oncology*, 2011;120: 430–438.
3. Jeantet D, Schwarzmann F, Tromp J, Melchers WJ, Van Der Wurff A, Oosterlaken T. NucliSENS EasyQ HPV v1 test—testing for oncogenic activity of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*, 2009; 45 (Suppl 1):S29–S37.
4. Deiman B, Van Aarle P, Sillekens P. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Molecular Biotechnology*, 2002;20:163–179.
5. Kacian DL and Fultz TJ. Nucleic acid sequence amplification methods. U. S. Patent 1995, 5,399,491).
6. Arnold LJ, Hammond PW, Wiese WA, Nelson NC. Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. *Clinical Chemistry* 1989;35: 1588-1594.
7. Cattani P, Zannoni GF, Ricci C, D’Onghia S, Trivellizzi IN, Di Franco A, Vellone VG, Durante M, Fadda G, Scambia G, Capelli G, De Vincenzo R. Clinical Performance of Human Papillomavirus E6 and E7 mRNA Testing for High-Grade Lesions of the Cervix. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009;47:3895-3901.
8. Monsonego J, Hudgens MG, Zerat L, Zerat JC, Syrjanen K, Smith JS. Risk assessment and clinical impact of liquid-based cytology, oncogenic human papillomavirus (HPV) DNA and mRNA testing in primary cervical cancer screening (The FASE Study). *Gynecologic Oncology*, 2012;125:175-80.
9. Ratnam S, Coutlee F, Fontaine D, Bentley J, Escott N, Ghatage P, Gadag V, Holloway G, Bartellas E, Kum N, Giede C, Lear A. Clinical performance of the PreTect HPV-Proofer E6/E7 mRNA assay in

- comparison with that of the Hybrid Capture 2 test for identification of women at risk of cervical cancer. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010;48(8):2779-85.
10. Rijkaart DC, Heideman DAM, Coupe VM, Brink AA, Verheijen RH, Skomedal H, Karlsen F, Morland E, Snijders PJ, Meijer CJ. High-Risk Human Papillomavirus (hrHPV) E6/E7 mRNA Testing by PreTect HPV-Proofer for Detection of Cervical High-Grade Intraepithelial Neoplasia and Cancer among hrHPV DNA-Positive Women with Normal Cytology. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012;50:2390-6.
 11. Munkhdelger J, Kim G, Wang HY, Lee D, Kim S, Choi Y, Choi E, Park S, Jin H, Park KH, Lee H. Performance of HPV E6/E7 mRNA RT-qPCR for screening and diagnosis of cervical cancer with ThinPrep® Pap test samples. *Experimental and Molecular Pathology*, 2014;97:279-84.
 12. Verdoodt F, Szarewski A, Halfon P, Cuschieri K, Arbyn M. Triage of women with minor abnormal cervical cytology: meta-analysis of the accuracy of an assay targeting messenger ribonucleic acid of 5 high-risk human papillomavirus types. *Cancer Cytopathology*, 2013;121(12):675-87.
 13. Arbyn M, Roelens J, Cuschieri K, Cuzick J, Szarewski A, Ratnam S, Reuschenbach M, Belinson S, Belinson JL, Monsonego J. The APTIMA HPV assay versus the Hybrid Capture 2 test in triage of women with ASC-US or LSIL cervical cytology: a meta-analysis of the diagnostic accuracy. *International Journal of Cancer*, 2013;132(1):101-8.
 14. Sorbye SW, Fismen S, Gutteberg T, Mortensen ES. Triage of women with minor cervical lesions: data suggesting a "test and treat" approach for HPV E6/E7 mRNA testing. *PLoS One*, 2010;13;5(9):e12724.
 15. Sorbye SW, Arbyn M, Fismen S, Gutteberg TJ, Mortensen ES. Triage of women with low-grade cervical lesions--HPV mRNA testing versus repeat cytology. *PLoS One*, 2011;6(8):e24083.
 16. Sorbye SW, Fismen S, Gutteberg TJ, Mortensen ES, Skjeldestad FE. HPV mRNA is more specific than HPV DNA in triage of women with minor cervical lesions. *PLoS One*. 2014;18;9(11):e112934.

17. Arbyn M, Buntinx F, Van Ranst M, Paraskevaïdis E, Martin-Hirsch P. 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*, 2004; 96: 280–293.
18. Arbyn M, Paraskevaïdis E, Martin-Hirsch P, Prendiville W, Dillner J. Clinical utility of HPV-DNA detection: triage of minor cervical lesions, follow up of women treated for high-grade CIN: an update of pooled evidence. *Gynecologic Oncology*, 2005; 99(3 Suppl 1): S7–11
19. Boardman LA, Kennedy CM. Management of atypical squamous cells, low-grade squamous intraepithelial lesions, and cervical intraepithelial neoplasia 1. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 2008;35: 599-614
20. Wright TC, Jr, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2007;197: 346–355.
21. Ronco G, Cuzick J, Segnan N, Brezzi S, Carozzi F, et al. HPV triage for low grade (L-SIL) cytology is appropriate for women over 35 in mass cervical cancer screening using liquid based cytology. *European Journal of Cancer*, 2007;43: 476–480.
22. Thrall MJ, Smith DA, Mody DR. Women \geq 30 years of age with low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) have low positivity rates when cotested for high-risk human Papillomavirus: should we reconsider HPV triage for LSIL in older women? *Diagnostic Cytopathology*, 2010; 38: 407–412.
23. Arbyn M, Martin-Hirsch P, Buntinx F, Van Ranst M, Paraskevaïdis E, et al. Triage of women with equivocal or low-grade cervical cytology results: a meta-analysis of the HPV test positivity rate. *J Cell Mol Med*, 2009; 13: 648-659
24. Arbyn M, Martin-Hirsch P, Buntinx F. Immediate colposcopy referral in women with low-grade abnormal results on cervical cytology detects more CIN2 or worse lesions than cytological surveillance in primary care, but might lead to overtreatment. *Evidence Based Medicine*, 2010;15: 13–14.

25. Ovestad IT, Vennestrøm U, Andersen L, Gudlaugsson E, Munk AC, Malpica A, Feng W, Voorhorst F, Janssen EA, Baak JP. Comparison of different commercial methods for HPV detection in follow-up cytology after ASCUS/LSIL, prediction of CIN2-3 in follow up biopsies and spontaneous regression of CIN2-3. *Gynecologic Oncology*, 2011;123(2):278-83
26. Sorbye SW, Arbyn M, Fismen S, Gutteberg TJ, Mortensen ES. HPV E6/E7 mRNA testing is more specific than cytology in post-colposcopy follow-up of women with negative cervical biopsy. *PLoS One*, 2011;6(10):e26022
27. The National Health Service Cervical Screening Programme (NHSCSP) Guidelines for Colposcopy and Programme Management – second edition. *NHSCSP Publication No 20, May 2010*. ISBN 978-1-84463-069-1. www.cancerscreening.nhs.uk
28. Zuchna C, Hager M, Tringler B, Georgouloupoulos A, Ciresa-Koenig A, Volgger B, Widschwendter A, Staudach A. Diagnostic accuracy of guided cervical biopsies: a prospective multicenter study comparing the histopathology of simultaneous biopsy and cone specimen. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2010;203:321.e1-6.
29. Massad LS, Jeronimo J, Katki HA, Schiffman M, National Institutes of Health/American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (The NIH/ASCCP) Research Group. The Accuracy of Colposcopic Grading for Detection of High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 2009; 13(3):137-144
30. Bollen LMJ, Tjong-A-Hung SP, van der Veiden J, Mol BW, ten Kate FW, ter Schegget J, Bleker OP. Prediction of recurrent cervical dysplasia by human papillomavirus detection among patients with abnormal cytology. *Gynecologic Oncology*, 1999 ;72:199–201
31. Paraskevaidis E, Arbyn M, Sotiriadis A, Diakomanolis E, Martin-Hirsch P, Koliopoulos G, Makrydimas G, Tofoski J, Roukos DH. The role of HPV DNA testing in the follow-up period after treatment for CIN: a systematic review of the literature. *Cancer Treatment Reviews*, 2004;30:205-11

32. Jordan J, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Schenk U, Baldauf JJ, Da Silva D, Anttila A, Nieminen P, Prendiville W. European guidelines for clinical management of abnormal cervical cytology, Part 2. *Cytopathology*, 2009; 20:5–16.
33. Soutter WP, Sasieni P, Paraskevaidis E. Long-term risk of invasive cervical cancer after treatment of squamous cervical intraepithelial neoplasia. *International Journal of Cancer*, 2006, 118:2048-55.
34. Heymans J, Benoy IH, Poppe W, Depuydt CE. Type specific HPV geno-typing improves detection of recurrent high-grade cervical neoplasia after conisation. *International Journal of Cancer*, 2011;129, 903-909
35. Massad LS, Einstein MH, Huh WK, Katki HA, Kinney WK, Schiffman M, Solomon D, Wentzensen N, Lawson HW. 2012 ASCCP Consensus Guidelines Conference. 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. *Obstetrics and Gynecology*, 2013;121:829-46.
36. Costa S, De Simone P, Venturoli S, Cricca M, Zerbini ML, Musiani M, Terzano P, Santini D, Cristiani P, Syrjanen S, Syrjanen K. Factors predicting human papillomavirus clearance in cervical intraepithelial neoplasia lesions treated by conization. *Gynecologic Oncology*, 2003;90:358-65
37. Kocken M, Helmerhorst TJ, Berkhof J, Louwers JA, Nobbenhuis MA, Bais AG, Hogewoning CJ, Zaal A, Verheijen RH, Snijders PJ, Meijer CJ. Risk of recurrent high-grade cervical intraepithelial neoplasia after successful treatment: a long-term multi-cohort study. *Lancet Oncology*, 2011; 12: 441–50.
38. Venturoli S, Ambretti S, Cricca M, Leo S, Costa S, Musiani M, Zerbini M. Correlation of high-risk human papillomavirus genotypes persistence and risk of residual or recurrent cervical disease after surgical treatment. *Journal of Medical Virology*, 2008;80:1434-40.

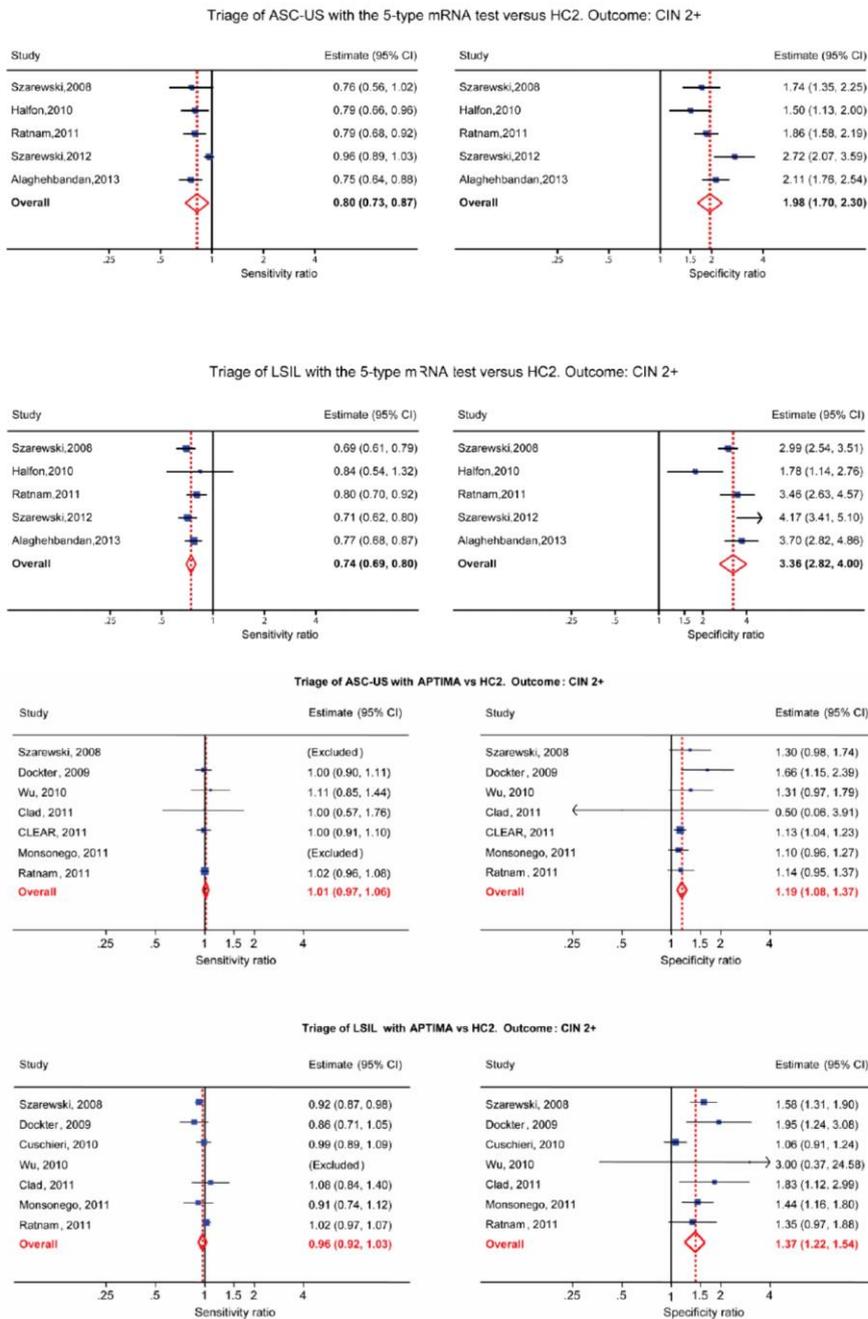
39. Zappacosta R, Ianieri MM, Tinelli A, Gustapane S, D'Angelo C, Gatta DM, Capanna S, Rosini S. Detection of residual/recurrent cervical disease after successful LEEP conization: the possible role of mRNA-HPV test. *Current Pharmaceutical Design*, 2013;19(8):1450-7.
40. Frega A, Sesti F, Lombardi D, Votano S, Sopracordevole F, Catalano A, Milazzo GN, Lombardo R, Assorgi C, Olivola S, Chiusuri V, Ricciardi E, French D, Moscarini M. Assessment of HPV-mRNA test to predict recurrent disease in patients previously treated for CIN 2/3. *Journal of Clinical Virology*, 2014;60(1):39-43.
41. Rositch AF, Soeters HM, Offutt-Powell TN, Wheeler BS, Taylor SM, Smith JS . The incidence of human papillomavirus infection following treatment for cervical neoplasia: a systematic review. *Gynecologic Oncology*, 2014;132:767-79.
42. Cricca M, Morselli-Labate AM, Venturoli S, Ambretti S, Gentilomi GA, Gallinella G, Costa S, Musiani M, Zerbini M. Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. *Gynecologic Oncology*, 2007;106:549-57.
43. Frega A, Sesti F, Lombardi D, Votano S, Sopracordevole F, Catalano A, Milazzo GN, Lombardo R, Assorgi C, Olivola S, Chiusuri V, Ricciardi E, French D, Moscarini M. Assessment of HPV-mRNA test to predict recurrent disease in patients previously treated for CIN 2/3. *Journal of Clinical Virology*, 2014;60:39-43.
44. Oliveira A, Verdasca N, Pista Â. Use of the NucliSENS EasyQ HPV assay in the management of cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of Medical Virology*, 2013;85(7):1235-41.
45. Benevolo M, Vocaturo A, Caraceni D, French D, Rosini S, Zappacosta R, Terrenato I, Ciccocioppo L, Frega A, Giorgi Rossi P. Sensitivity, specificity, and clinical value of human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA assay as a triage test for cervical cytology and HPV DNA test. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011;49(7):2643-50

46. Zappacosta R, Gatta DM, Marinucci P, Capanna S, Lattanzio G, Caraceni D, Rosini S. Role of E6/E7 mRNA test in the diagnostic algorithm of HPV-positive patients showing ASCUS and LSIL: clinical and economic implications in a publicly financed healthcare system. *Expert Review of Molecular Diagnosis*, 2015;15(1):137-50.
47. Koliopoulos G, Chrelias C, Pappas A, Makridima S, Kountouris E, Alepaki M, Spathis A, Stathopoulou V, Panayiotides I, Panagopoulos P, Karakitsos P, Kassanos D. The diagnostic accuracy of two methods for E6&7 mRNA detection in women with minor cytological abnormalities. *Acta Obstetrica Gynecologica Scandinava*. 2012;91(7):794-801
48. Rijkaart DC, Heideman DA, Coupe VM, Brink AA, Verheijen RH, Skomedal H, Karlsen F, Morland E, Snijders PJ, Meijer CJ. High-risk human papillomavirus (hrHPV) E6/E7 mRNA testing by PreTect HPV-Proofer for detection of cervical high-grade intraepithelial neoplasia and cancer among hrHPV DNA-positive women with normal cytology. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012;50(7):2390-6.
49. Munkhdelger J, Choi Y, Lee D, Kim S, Kim G, Park S, Choi E, Jin H, Jeon BY, Lee H, Park KH. Comparison of the performance of the NucliSENS EasyQ HPV E6/E7 mRNA assay and HPV DNA chip for testing squamous cell lesions of the uterine cervix. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2014;79(4):422-7.
50. Perez Castro S, Iñarrea Fernández A, Lamas González MJ, Sarán Diez MT, Cid Lama A, Alvarez Martín MJ, Pato Mosquera M, López-Miragaya I, Estévez N, Torres Piñón J, Oña Navarro M. Human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA as a triage test after detection of HPV 16 and HPV 18 DNA. *Journal of Medical Virology*, 2013;85(6):1063-8
51. Hovland S, Muller S, Skomedal H, Mints M, Bergström J, Wallin KL, Karlsen F, Johansson B, Andersson S. E6/E7 mRNA expression analysis: a test for the objective assessment of cervical adenocarcinoma in clinical prognostic procedure. *International Journal of Oncology*, 2010;36(6):1533-9.

52. Argyri E, Tsimplaki E, Daskalopoulou D, Stravopodis DJ, Kouikoglou O, Terzakis E, Panotopoulou E. E6/E7 mRNA expression of high-risk HPV types in 849 Greek women. *Anticancer Research*, 2013 ;33(9):4007-11
53. Möckel J, Quaas J, Meisel H, Endres AS, Schneider V. Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing has higher specificity than liquid-based DNA testing in the evaluation of cervical intraepithelial neoplasia. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 2011;33(6):311-5.

Tables and Figures

Table 1. Performance of E6/E7 HPV mRNA and DNA tests.



[From Verdoodt (12) and Arbyn (13)]

Figura 1. The NASBA RNA amplification technology

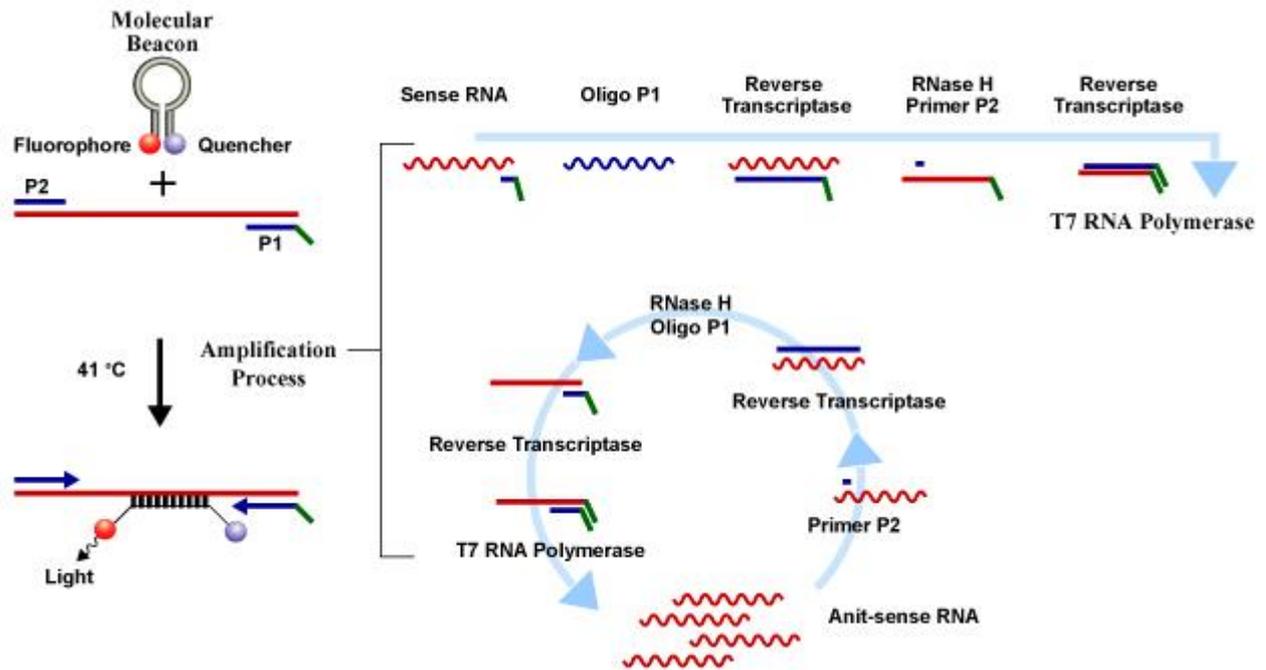


Figura 2. The TMA RNA amplification technology

