

ANÁLISIS DE LA INMUNIDAD DE LAS MUJERES INFECTADAS POR EL VIRUS DE L PAPILOMA HUMANO Y SU RELACIÓN CON LA LESIÓN INTRAEPITELIAL CERVICAL (ESTUDIO IMVIR)



Autores: Cantero Piñeiro J, Ramírez Mena M, Fernández Paredes L, Ruipérez Pacheco E, Coronado Martín P
Hospital Clínico San Carlos. Instituto de Salud de la mujer.

RESUMEN

Introducción: el objetivo principal es estudiar los marcadores de NK memoria presentes en sangre periférica en pacientes con lesiones cervicales intraepiteliales de alto grado CIN2/3 frente a mujeres sin lesiones o con lesiones de bajo grado. **Material y métodos:** se trata de un estudio observacional prospectivo de una cohorte de mujeres reclutadas desde el año 2019, durante un periodo de 2 años en la Unidad del tracto genital inferior en las consultas de ginecología general del Instituto de Salud de la Mujer del Hospital Clínico San Carlos. Los grupos de pacientes incluidos en el estudio son: el grupo de estudio, mujeres con infección por VPH y con lesión cervical de alto grado (CIN2+); grupo control 1, mujeres con infección por el VPH sin lesión cervical de alto grado y el grupo control 2, mujeres sin infección por el VPH y sin lesión. **Resultados:** Durante el estudio se han reclutado 115 pacientes. Cuando se analizan las pacientes no fumadoras, la expresión de Nkp30 es menor, significativamente en el grupo control 1. **Conclusiones:** Los resultados ponen de manifiesto una probable menor capacidad para desarrollar funciones adaptativas por parte de las células NK en estas pacientes fumadoras frente a las no fumadoras. Un mejor conocimiento de la biología de las células NK y su papel en la infección por el VPH podría permitir el desarrollo de estrategias para manipular su funcionamiento.

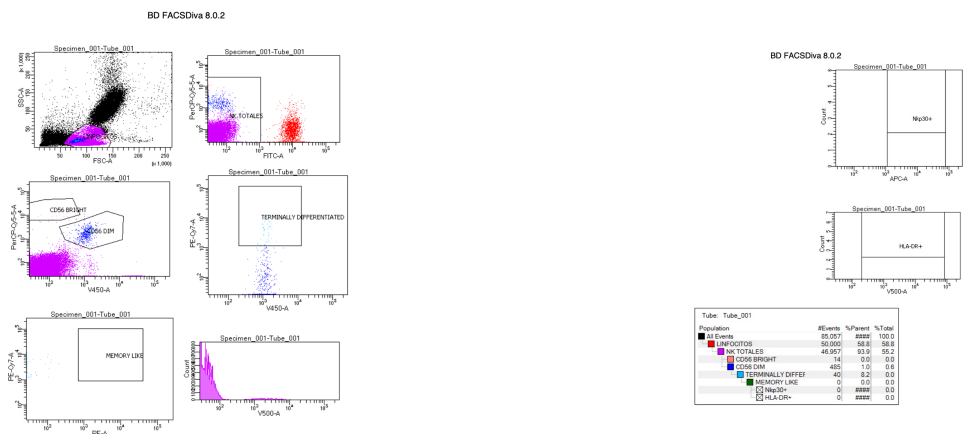
INTRODUCCIÓN

El cáncer de cérvix es la 4ª neoplasia más frecuente en la mujer a nivel mundial, se calcula que en 2020 se diagnosticaron unos 604.000 nuevos casos, suponiendo un 6.5% de los cánceres en mujeres y se registraron un total de 341.831 muertes, lo cual supone un 7.7% de las muertes por cáncer en mujeres. El cáncer de cérvix es la 4ª neoplasia que más muertes causa en mujeres tras el cáncer de mama, el cáncer de pulmón y el cáncer colorectal. El virus del papiloma humano (VPH) es el agente responsable del cáncer de cérvix. La relación entre la inmunidad del huésped y la infección del VPH se ha visto corroborada por diversos estudios. Así, se ha comprobado que las mujeres con inmunosupresión presentan una mayor tasa de infección por VPH, de lesiones de alto grado y de progresión a cáncer invasor. Varios estudios han demostrado como la inmunidad es un factor predictor independiente de recurrencia de estas lesiones. La introducción de las vacunas frente al VPH también ha demostrado como la inmunidad es un factor relevante. Sin embargo, aún se desconoce si la infección se depura completamente o puede persistir y reactivarse transcurrido un tiempo de latencia, y si esto está asociado al genotipo del virus, a la edad de la mujer o al sistema inmune. Es conocido el papel clave que juegan las células NK en la respuesta antiviral en fases iniciales de la infección. Las NK reconocen y eliminan el patógeno o la célula tumoral mediante varios mecanismos: reconocimiento de señales de peligro mediante una serie de receptores activadores como pueden ser Nkp30, Nkp46 o NKG2D, y una vez activadas pueden eliminar la célula dañada a través de mecanismos de degranulación de granzimas y perforinas, o mediante la unión de receptores CD16 a IgG, estimulando la citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Se ha observado en diferentes tipos de cáncer, una disminución tanto en número de células NK infiltradas en el tumor y en sangre periférica, como en la expresión de estos receptores activadores; sobreexpresándose por el contrario, los receptores inhibidores lo que potencia la inmunosupresión. La finalidad del proyecto es analizar la relación entre la respuesta del sistema inmune, concretamente de las células NK y la capacidad de infestación, integración, daño citotóxico y evolución de las lesiones tras la interacción con el VPH. El objetivo principal es estudiar los marcadores de células NK memoria presentes en sangre periférica de pacientes con lesiones cervicales intraepiteliales de alto grado CIN 2/3 frente a mujeres sin lesiones o con lesiones de bajo grado. Los objetivos secundarios son estudiar si existe relación entre el perfil de células NK memoria y la infección o no por VPH, así como la persistencia viral en las mujeres infectadas por VPH.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio observacional prospectivo de una cohorte de mujeres infectadas por el virus del papiloma humano (VPH) en el tracto genital inferior (TGI). Todas las mujeres se han reclutado en la Unidad del tracto Genital Inferior o en las consultas de Ginecología general del Instituto de Salud de la Mujer del Hospital Clínico San Carlos de Madrid durante un periodo de 2 años desde mayo de 2019. Se analizan los siguientes grupos de pacientes:
- Grupo de estudio: mujeres CON infección por el VPH y CON lesión cervical de alto grado (CIN2+).
- Grupo control 1: mujeres CON infección por el VPH y SIN lesión cervical de alto grado. Se eligen los controles emparejados con la edad de los casos para evitar las posibles alteraciones inmunológicas debidas a la edad.
- Grupo control 2: mujeres SIN infección por el VPH y SIN lesiones asociadas, que sirven de control sano para analizar el perfil normal de NK. Las mujeres integrantes de este grupo se han emparejado por edad igual a la de los casos. Se analizan variables sociodemográficas: edad, índice de masa corporal, hábitos tóxicos, comportamiento sexual, infecciones de transmisión sexual, etc. Las variables relacionadas con el VPH serán relativas al genotipo y número de genotipos presentes en las muestras. Respecto a las lesiones del TGI se analiza el sitio de la lesión, la citología cervico-vaginal, la histología de la lesión obtenida por biopsia y su grado. Las variables relacionadas con la inmunidad serán la detección de células NK memoria y sus subtipos además del porcentaje de linfocitos encontrados mediante la citometría de flujo (linfocitos, NK totales, CD56Ngrth, CD56DIM, Tomyall differ, Memory Like, Nkp30+%, HLA DR+%, Nkp30+MFI, HLA DR +MFI). A todas las pacientes incluidas se les ha realizado una citología en medio líquido (ThinPrep®) con determinación del ADN del VPH mediante la prueba CLART HPV2 que puede detectar 35 genotipos diferentes usando múltiples PCR. A todas las mujeres se les ha extraído sangre para la determinación de hemograma y serologías, así como para el perfil de inmunidad. La muestra tomada para analizar el perfil de inmunidad se ha analizado en el laboratorio de inmunología del Hospital Clínico San Carlos. Se les ha extraído un tubo de EDTA de 5cc para su posterior procesamiento y análisis por citometría de flujo (FACS Canto II, BD, San José, CA). Se analizan las subpoblaciones de células NK memoria, claves en la defensa anti-viral y anti-tumoral, por citometría de flujo multiparamétrica. Los paneles que se han utilizado para el estudio de NK memoria son: CD3+, CD56+, CD16+, NKG2C+, CD57+, Nkp30, HLADR. **Figura 1.** A todas las mujeres infectadas por el VPH se les ha realizado seguimiento cada 6 meses con determinación del ADN-VPH, citología y colposcopia hasta completar 24 meses. Las mujeres con diagnóstico histológico de CIN, VIN, VAIN o con cáncer invasor se han tratado según las recomendaciones y guías de la Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología (SEGO) y la Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia (AEPCC).

Figura 1. Ejemplo del resultado de uno de los análisis con citometría de flujo de una de las pacientes. Representación gráfica de los miles de células analizadas en la muestra mediante la cuantificación de los destellos de fluorescencia.



RESULTADOS

Durante el estudio se han reclutado 115 pacientes en un periodo de 2 años (desde mayo de 2019), 39 del grupo control 1, 17 del grupo control 2 y 59 del grupo de estudio. Se ha realizado analítica con hemograma, serología para VHB, VHC, VIH y Sífilis y extracción de tubo de EDTA para estudio de la muestra en el laboratorio de inmunología a 59 pacientes: 22 pacientes del grupo control 1, 8 pacientes del grupo control 2 y 29 pacientes del grupo de estudio. De esas 59 pacientes, 54 son las que se han incluido en el análisis estadístico: 20 del grupo control 1, 7 del grupo control 2 y 27 del grupo de estudio. 5 de las pacientes a las que se les ha realizado la citometría no se han podido incluir en el análisis: 1 por falta de datos, 1 por diagnóstico de carcinoma infiltrante, otra por ser diagnosticada de esclerosis múltiple en tratamiento inmunosupresor tras ser realizado el análisis para la citometría y otras 2 de las pacientes por estar embarazadas. **Figura 2.** La edad media de las pacientes analizadas es de 37 años, con una desviación típica de 8 años. La media de cigarrillos consumidos por las pacientes es de 3, con una desviación típica de 6. La media del número de parejas sexuales a lo largo de la vida en las pacientes del estudio es de 8, con una desviación típica de 6. La edad media de la primera relación sexual en las pacientes incluidas en el estudio son 17 años, con una desviación típica de 2 años, con una edad mínima de inicio de las relaciones a los 15 años y máxima de 26 años. **Tabla 1.** En el análisis estadístico del perfil inmunológico por grupo no se objetivan diferencias estadísticamente significativas entre: linfocitos, NK totales, CD56 Brighth, CD 56 DIM, Terminally differentiated, memory like, Nkp30+ y HLA-DR+. La prueba estadística empleada ha sido la Prueba de Mann-Whitney. **Tabla 2.** En el análisis estadístico del perfil inmunológico en las pacientes fumadoras y las no fumadoras mediante la prueba de Mann-Whitney se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la presencia de Nkp30+ y HLA-DR+, con una mayor presencia de Nkp30+ en las pacientes fumadoras y una menor presencia de HLA- DR+ en las pacientes fumadoras también (p 0.12 para Nkp30+, p 0.017 par HLA-DR+). **Tabla 3.**

Figura 2. Pacientes reclutadas en el estudio en cada grupo. Número de pacientes analizadas de cada grupo mediante citometría. Número de pacientes finalmente incluidas en el análisis estadístico.

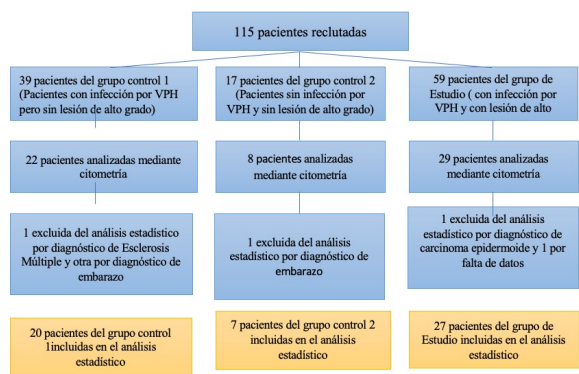


Tabla 1. Resultados descriptivos por grupos en cuanto a edad, número de cigarrillos y edad de la primera relación sexual.

	Edad (Media y DT)*	Número de cigarrillos (Media y DT)	Número de parejas sexuales (Media y DT)	Edad de la primera relación sexual (Media y DT)
Grupo control 1 (n=26)	36 ± 8	4 ± 8 (5 valores perdidos)	9 ± 6 (6 valores perdidos)	17 ± 2 (6 valores perdidos)
Grupo control 2 (n=7)	40 ± 10	0 ± 0 (1 valor perdido)	5 ± 6 (2 valores perdidos)	17 ± 2 (2 valores perdidos)
Grupo de Estudio (n=27)	38 ± 9	3 ± 6 (5 valores perdidos)	9 ± 7 (4 valores perdidos)	17 ± 3 (4 valores perdidos)

*Desviación típica

Tabla 2. Análisis estadístico del perfil inmunológico por grupo mediante la Prueba de Mann-Whitney. No se objetivan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, pero llama la atención una mayor presencia de Nkp30+ en el grupo control 2 y una mayor presencia de HLA-DR+ en el grupo de estudio.

	Grupo control 1 n=26	Grupo control 2 n=7	Grupo de Estudio n=27	p
Linfocitos (%) (Media y DT)*	23,73 ± 6,08	22,26 ± 6,32	28,77 ± 17,33	0,498
NK totales (%) (Media y DT)	9,88 ± 6,2	12,86 ± 7,78	9,84 ± 6,02	0,698
CD56 Brighth (%) (Media y DT)	3,94 ± 1,2	4,23 ± 1,99	3,42 ± 1,94	0,413
CD56 DIM (%) (Media y DT)	89,18 ± 4,74	85,51 ± 11,3	84,7 ± 15,34	0,576
Terminally differentiated (%) (Media y DT)	40,11 ± 16,26	34,91 ± 12,67	41,36 ± 20,4	0,983
Memory like (%) (Media y DT)	15,28 ± 19,97	6,76 ± 4,51	22,23 ± 26,69	0,583
Nkp30+ (%) (Media y DT)	58,71 ± 30,22	76,66 ± 20,65	46,58 ± 37,04	0,302
HLA-DR+ (%) (Media y DT)	9,54 ± 9,16	11,14 ± 17,67	12,01 ± 12,79	0,705

*Desviación típica

Tabla 3. Análisis estadístico del perfil inmunológico de las pacientes fumadoras y no fumadoras mediante la Prueba de Mann-Whitney (11 valores perdidos en cuanto a ser fumadora o no). Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas, con una mayor presencia de Nkp30+ en las pacientes fumadoras y una menor presencia de HLA-DR+ en las pacientes fumadoras.

	Fumadoras n=15	No fumadoras n=28	P
Linfocitos (%) (Media y DT)*	27,05 ± 13,21	24,59 ± 7	0,909
NK totales (%) (Media y DT)	9,51 ± 5,26	11,44 ± 6	0,279
CD56 Brighth (%) (Media y DT)	4,24 ± 2,25	3,46 ± 1,72	0,273
CD56 DIM (%) (Media y DT)	89,54 ± 4,83	87,7 ± 9,89	0,919
Terminally differentiated (%) (Media y DT)	34,89 ± 20,39	42,05 ± 16,6	0,150
Memory like (%) (Media y DT)	12,29 ± 20,47	16,7 ± 20,61	0,169
Nkp30+ (%) (Media y DT)	71,89 ± 28,27	46,36 ± 31,81	0,012
HLA-DR+ (%) (Media y DT)	5,57 ± 7,63	13,2 ± 12,58	0,017

*Desviación típica

DISCUSIÓN

A pesar de no haberse encontrado diferencias estadísticamente significativas en el análisis del perfil inmunológico por grupo, llama la atención la presencia de mayor número de Nkp30+ en el grupo control 2, con una media de 58,71% para el grupo control 1, de 76,66% para el grupo control 2 y de 46,58% para el grupo de estudio (Tabla 2), lo cual sugiere que en los grupos control 1 y en el grupo de estudio, al haber estado en contacto con el VPH, presentan una menor expresión de Nkp30+ y por lo tanto presentarían mayor número de células NK con una función "adaptativa" o de "memoria". **Tabla 2.** Como se describe en los resultados, el hallazgo de diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la presencia de Nkp30+ y HLA-DR+, con una mayor presencia de Nkp30+ en las pacientes fumadoras y una menor presencia de HLA-DR+ en las pacientes fumadoras también (p 0.12 para Nkp30+, p 0.017 par HLA-DR+), podría sugerir una menor capacidad para generar células NK con una función "adaptativa" o de "memoria" en las pacientes fumadoras frente a las no fumadoras. Estas diferencias destacan también al comparar a las pacientes fumadoras y las no fumadoras del grupo control 1 y a las pacientes fumadoras y no fumadoras del grupo de estudio. **Tabla 3.** Lo que mencionamos en los puntos anteriores se ha observado también en pacientes con infección (crónica) por citomegalovirus. Nkp30 es un receptor de citotoxicidad natural y se relaciona con la transducción de señales para la activación de NK al asociarse con diferentes señales de activación. Mientras que las células NK con "funciones innatas", ejercen su función sobre todo a través de este y otros receptores que promueven una toxicidad "natural", las células NK "memoria" o "adaptativas" disminuyen la expresión de Nkp30 porque estas funciones las tienen disminuidas (la citotoxicidad "natural" y la respuesta a determinadas citoquinas producidas por células del sistema inmune innato), y tienen potenciadas las de ADCC y producción de IFNgamma. Hasta hace muy pocos años se desconocía que las células consideradas del sistema inmunitario innato pudiesen tener un perfil de memoria (antiguamente reservado solo a linfocitos T y B).

CONCLUSIONES

Hemos cumplido con el objetivo principal del estudio de estudiar los marcadores de células NK memoria presentes en sangre periférica de pacientes con lesiones cervicales intraepiteliales de alto grado CIN 2/3 frente a mujeres sin lesiones o con lesiones de bajo grado, aunque el número de pacientes analizadas ha sido menor de lo esperado debido a la situación de la pandemia. Lo comentado en cuanto a lo que encontramos en las pacientes fumadoras y la expresión de Nkp30+ pone de manifiesto una probable menor capacidad para desarrollar funciones más "adaptativas" por parte de las células NK en estas pacientes. Un mejor conocimiento de la biología de las células NK y su papel en la infección por el VPH podría permitir el desarrollo de estrategias para manipular su funcionamiento (inmunoterapias) con un propósito terapéutico y también nos podría orientar en cuanto a aquellas pacientes que pueden presentar más riesgo frente a la infección por el VPH, por una menor capacidad para hacer frente a la infección.

Este estudio se ha podido llevar a cabo gracias a una Beca otorgada por la Fundación Dexeus Mujer en el año 2019.

Bibliografía:

- Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. CA Cancer J Clin. 2018;68(6):394. Epub 2018 Sep 12.
- Coronado Martín PJ; Fasero Laiz M; Ramírez Mena M; Arab Eblen C; Bellón del Amo M; García Santos J; Vidart Aragón JA. La inmunosupresión es un factor mayor de riesgo de la recidiva de las lesiones del tracto genital inferior asociadas al virus del papiloma humano. Prog Obstet Ginecol 2010;53(5):179-88.
- Langers I, Renoux VM, Thiry M, Delvenne P, Jacobs N. Natural Killer cells: role in local tumor growth and metastasis. Biologics. 2012; 6:73-82
- Anna Paaso; Anna Jaakola; Stina Syrjänen; Karolina Lohvanto; From HPV Infection to Cancer Progression: The Role of DNA Alkylating Host Immunity. Acta Cytologica. February 15, 2019
- Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. Cellular & Molecular Immunology (2013) 10: 230-252.
- Hui Peng and Zhigang Tian. Natutal Killer Cell Memory: Progress and Implications. Frontiers in immunology.13 of September of 2017.