

TRABAJO ORIGINAL

Identificación de Virus Papiloma Humano 16 (VPH-16) en carcinoma queratinizante de pulmón

FRANCISCO AGUAYO G.*, MANUEL MENESES M.**, ALEJANDRO CORVALÁN R.**, MARÍA LUISA MUÑOZ S.**, CHILAYA KORIYAMA****, YOSHITO EIZURU**** y SUMINORI AKIBA****

IDENTIFICATION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS 16 (HPV 16) IN KERATINIZING LUNG CARCINOMA

Lung cancer is the first cause of death by cancer in the world and the fourth cause in Chile. The histological type squamous cell carcinoma represents between 35% to 50% of the cases. Strong evidence exists about the association between this histological type and the human papilloma virus (HPV) infection, being genotypes HPV-16 and 18 those that have an strong association. We analyzed cases of lung squamous cell carcinoma of the keratinizing type to evaluate the presence of HPV 16 and 18 genotypes in Chile. Thirteen cases with histological diagnosis of keratinizing highly or moderately differentiated squamous cell carcinoma were analyzed. Samples were formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. DNA was extracted with proteinase K and it was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) using specific primers for generic HPV, HPV 16, HPV 18 and human betaglobin as internal positive control. The amplified products were revealed in polyacrilamide gels. We identified the presence of HPV in 6 of 13 cases (42.2%). Of these cases, five corresponded to HPV-16 and none of them was HPV 18. The presence of HPV 16 in the analyzed series would indicate that HPV can have some function in the etiology of lung cancer of the keratinizing squamous cell type. The absence of HPV 18 in the analyzed series could indicate unique epidemiological characteristics of our studied population. It is necessary to perform another study with other genotypes of HPV and greater number of cases to confirm these results.

Key words: *Squamous cell carcinoma, Human papilloma virus, keratinizing.*

* Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Nacional del Tórax.

** Instituto de Anatomía Patológica, Hospital del Salvador.

*** Instituto Chileno Japonés Enfermedades Digestivas, Hospital San Borja Arriarán.

**** Depto. Salud Pública y Virología, Facultad de Medicina, Universidad de Kagoshima, Japón.

Financiamiento

Grants-in-Aid for Scientific Research (12218231) and International Scientific Research, Special Cancer Research (09042007) Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Japan.

RESUMEN

El cáncer pulmonar constituye la primera causa de muerte por cáncer en el mundo y la cuarta causa de muerte por cáncer en Chile. El carcinoma escamoso de pulmón representa entre el 35% a 50% de los casos de cáncer pulmonar. Existe fuerte evidencia, aunque aún controversial, respecto de la asociación entre esta forma histológica y la infección por Virus Papiloma Humano (VPH), siendo los genotipos VPH 16 y 18 los que se han asociado a lesiones malignas y premalignas de diversos tejidos epiteliales. Analizamos casos de carcinoma escamoso de pulmón del tipo queratinizante para evaluar la presencia de genotipos de VPH 16 y 18 en Chile. Quince casos con diagnóstico histológico de carcinoma escamoso moderada y altamente diferenciados en tejido incluido en parafina, fueron tratados con xilol y etanol y resuspendidos en proteinasa K durante 48 horas a 56° C para la extracción de ADN. Este se amplificó mediante la reacción de polimerasa en cadena (PCR) usando partidores específicos para VPH genérico, VPH 16, VPH 18 y betaglobina humana como control positivo interno. Los amplificados fueron revelados en geles de polacrilamida y tinción con nitrato de plata. Identificamos la presencia de VPH genérico en 6 (42,2%) de 13 casos amplificables. De estos casos todos correspondieron al genotipo VPH 16 y ninguno correspondió al genotipo VPH 18. La presencia de VPH 16 en la serie analizada indicaría que VPH puede tener algún rol en cáncer pulmonar del tipo escamoso - queratinizante. Es interesante la ausencia de VPH 18 en la serie analizada lo cual podría indicar características epidemiológicas propias en nuestra población. En esta serie analizada, una muestra mostró no corresponder a los genotipos estudiados. Es necesario realizar un estudio más amplio con otros genotipos de VPH y un universo mayor de casos para confirmar estos resultados.

INTRODUCCIÓN

El Virus Papiloma Humano (VPH) pertenece a la familia *Papovaviridae*, contiene DNA de doble hebra como material genético y tiene un especial tropismo hacia tejidos epiteliales¹. Su material genético es de aproximadamente 8 kilobases, conteniendo dos genes de expresión temprana con capacidades transformantes llamados E6 y E7, demostrado a través de estudios "in vitro" e "in vivo"². Se ha postulado que el mecanismo de transformación de estos genes sería a través de la unión e inactivación de genes supresores de tumores como p53 y p105 de retinoblastoma, respectivamente³. El material genético de VPH codifica para dos proteínas de expresión tardía llamadas L1 y L2 que constituyen la nucleocápside viral y cuya expresión ocurre solamente en estratos superiores de los epitelios, en conjunto

con la expresión de genes de diferenciación celular como fibronectina, laminina y queratina¹. En determinadas circunstancias el VPH puede no producir infección productiva y permanecer de manera episomal en el núcleo celular en estado de latencia o integrarse de manera estable al patrimonio genético celular provocando transformación^{1,4}.

La diversidad de VPH se ha definido en función genotípica. Cuando dos tipos virales presentan 50% o más de similaridad entre sus secuencias de ADN, corresponden al mismo genotipo. En base a este criterio se han definido más de 100 genotipos diferentes teniendo muchos de ellos un comportamiento fisiopatológico muy distinto^{1,5}. Se ha publicado la asociación entre la presencia de los genotipos 16, 18, 31, 33 y 35 con lesiones uterinas cervicales de alto riesgo de progresión a malignidad. Por otro lado, los genotipos 6 y 11 están

asociados a lesiones de bajo grado. Mediante la reacción de polimerasa en cadena (PCR), se ha demostrado la presencia de VPH 16 y 18 en lesiones preneoplásicas y neoplásicas de tejido uterino cervical, laringe, esófago, senos nasales y pulmón^{6,7,8}. En el tracto respiratorio, VPH 6 y 11 se han asociado con papilomatosis laringea juvenil, una patología que es benigna pero que puede malignizarse en pacientes expuestos a terapia con radiación⁹. Existen diversos reportes que asocian la infección con los genotipos de VPH 16, 18, 31, 33 y 35 con el carcinoma celular escamoso de pulmón (CEP), principalmente en pacientes con mucosa bronquial metaplásica debido al tabaquismo^{9,10,11}.

En ciertos países asiáticos se ha comunicado que el VPH pudiera estar asociado con el desarrollo de cáncer pulmonar en mujeres no fumadoras¹². En Okinawa, localidad ubicada al sudeste de Japón, se ha correlacionado el descenso en la presentación de CEP con un descenso en la incidencia de infección por VPH¹³.

En 1992, Popper y cols detectaron la presencia de VPH en 5 papilomas escamosos del bronquio y el genotipo viral mostró correlación con el grado de malignidad¹⁴, mientras que en el año 2001 Miasko y cols detectaron un 10% de VPH en carcinomas de no células pequeñas en población polaca¹⁵. Por otro lado, otros estudios como el de Clavel y cols sólo detectaron VPH mediante métodos moleculares en una pequeña proporción de casos de un total de 185 tumores broncopulmonares estudiados¹⁶.

No existen estudios en Chile respecto al Virus papiloma Humano y su potencial asociación con ciertos tipos histológicos de cáncer pulmonar, fundamentalmente el de tipo queratinizante moderada y altamente diferenciado. Nuestro trabajo ha sido analizar la presencia de VPH en muestras de carcinomas escamosos queratinizantes de pulmón (CEPQ), mediante amplificación genotipo-específica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras clínicas

Las muestras clínicas fueron obtenidas del sistema computacional de la Unidad de Anatomía Patológica del Hospital del Salvador, San-

tiago de Chile, haciendo coincidir las palabras "Pulmón", "Carcinoma", "Escamoso" y "Queratinizante". Se revisaron 4 años (1998-2001) con un total de 42.000 biopsias aproximadamente. Fueron revisados 25 tumores de CEP para la selección de 15 casos queratinizantes, los cuales correspondían a 13 pacientes analizados.

Los casos numerados 14 y 15 corresponden a un mismo paciente de sexo masculino. Los casos numerados 2 y 10 corresponden a una misma paciente de sexo femenino. La muestra global correspondió a 9 (71,4%) varones y 4 (28,6%) mujeres. La edad promedio del grupo estudiado fue de 64,1 años (33-77 años).

Extracción del material genético

Las muestras de tejido incluido en parafina fueron cortadas con microtomo en cortes de 5 μ m y colocadas en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Se agregó 1 ml de xilol, se agitó por 20 segundos y se centrifugó a 15.000 rpm por 10 minutos. Se agregó 1,0 ml de etanol puro a cada tubo, se mezcló por inversión y se centrifugó a 15.000 rpm por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 50 μ L de proteinasa K (1 mg/ml), bajo capa de aceite mineral y se incubó durante 48 horas a 56° C para extraer el DNA. Posteriormente, la mezcla fue sometida a agitación mediante vórtex durante 30 segundos, se centrifugó y el sobrenadante fue repurificado mediante el sistema Glassmax® (Gibco). Finalmente se obtuvieron 50 μ L de DNA para las reacciones de amplificación genómica.

Amplificación de secuencias de VPH genérico, 16 y 18.

La reacción de amplificación se realizó de acuerdo a protocolos establecidos¹⁷ y consistió en la amplificación del gen beta-globina (BG) como control positivo interno, la región L1 para la identificación genérica de VPH y secuencias específicas para la identificación de los tipos 16 y 18. Se usó termociclador MJ Research mod. Minicycler™. Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%. Para ello, se depositaron 12 μ L de producto amplificado con

2 μ L de *buffer* de carga, en conjunto con estándar de peso molecular de 25 bp. Las condiciones de corrida fueron 250 volts durante 2 horas en cámara de electrofóresis Mod. V-16 (Gibco) usando fuente de poder Mod. 250 Ex (Life Technologies). Posteriormente el gel fue teñido con solución de nitrato de plata durante 5 minutos. Los geles fueron documentados mediante programa gráfico Photoimpact®. Como control positivo externo se utilizó la línea celular SiHa que lleva incorporado genomas de VPH 16 y la línea celular HeLa, que incorpora genomas de VPH 18. Estas líneas celulares fueron extraídas de modo similar al procedimiento descrito para las muestras embebidas en parafina, disminuyendo el tiempo de extracción a 1 hora con proteinasa K y tampón de digestión.

RESULTADOS

Para validar la calidad del ADN en las muestras analizadas se utilizó la amplificación del gen BG humana. En 14 de 15 casos analiza-

dos se observó amplificación de BG y fueron considerados adecuados para análisis de VPH. Los resultados de VPH genérico, VPH 16 y VPH 18 se muestran en la Tabla 1. De los 14 casos amplificables, 6 (43%) fueron VPH 16 positivos y ninguno VPH 18. Por otra parte, los casos 2 y 10, que correspondieron a una misma paciente, resultaron ambos positivos para VPH 16.

La Figura 1 muestra un ejemplo de dos casos de CEPQ, uno positivo para VPH 16 y otro negativo. Se muestran además los controles positivos para VPH 16 y 18 que corresponden a productos de amplificación de DNA de células SiHa y HeLa junto con patrón de peso molecular.

DISCUSIÓN

De los 15 casos analizados sólo uno no fue amplificable mediante PCR, demostrado a través del análisis de un control positivo interno como es una secuencia del gen BG humana. Este gen, constitutivo de cualquier célula, nos

Tabla 1. Resultados de la amplificación por reacción de polimerasa en cadena de virus papiloma humano en carcinoma queratinizante del pulmón

Caso	Sexo	Edad	BG ^a	VPH ^b	VPH-16	VPH-18
1	M	66	+	+	-	-
2	F	39	+	+	+	-
3	M	68	+	-	-	-
4	M	73	+	-	-	-
5	F	63	+	-	-	-
6	M	57	+	+	+	-
7	M	71	+	+	+	-
8	M	75	+	-	-	-
9	M	77	+	+	+	-
10	F	39	+	+	+	-
11	ND	ND	+	-	-	-
12	F	69	+	-	-	-
13	M	69	+	-	-	-
14	M	73	+	-	+	-
15	M	73	-	-	-	-

^a BG, gen beta-globina humana utilizado como control positivo interno de amplificación.

^b VPH amplificación genérica de VPH utilizando partidores de región L1. ND: no determinado.

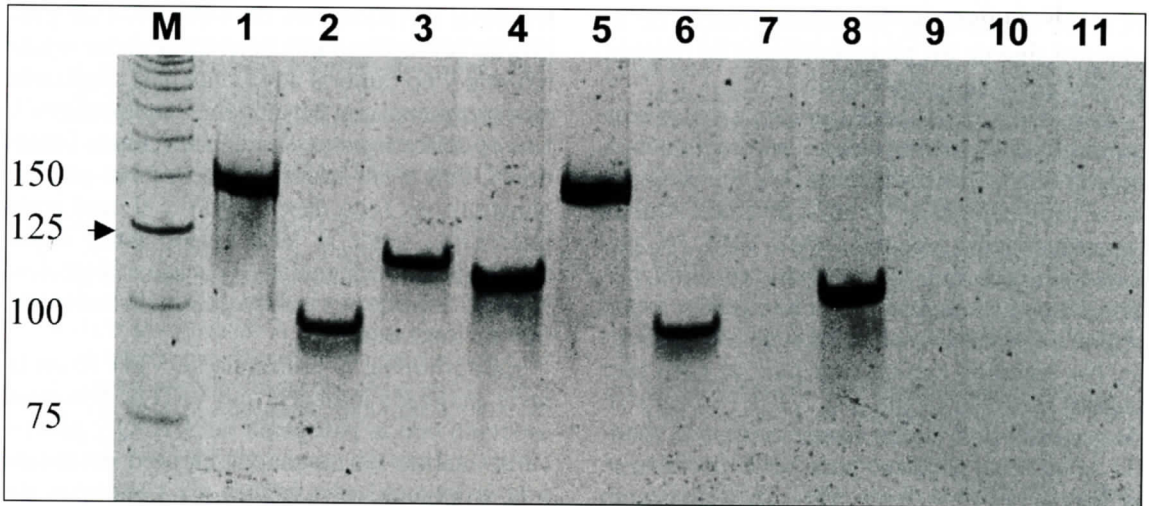


Figura 1. Detección de VPH en muestras de Carcinoma escamoso queratinizante de pulmón. **M:** peso molecular; **1-3:** Controles positivos. **1:** VPH genérico (SiHa); **2:** VPH 16 (SiHa); **3:** VPH 18 (HeLa); **4-11:** casos clínicos 2 y 3. **4 y 8:** betaglobina humana; **5 y 9:** VPH genérico; **6 y 10:** VPH 16; **7 y 11:** VPH 18.

proporciona un marcador de amplificación, permitiendo verificar presencia de inhibidores o ausencia de DNA proveniente de extractos celulares.

En general las muestras incluidas en parafina constituyen muestras complicadas para ser sometidas a amplificación mediante PCR puesto que su DNA se encuentra frecuentemente fragmentado en tamaños no superiores a 200 pares de bases¹⁸. Frecuentemente, como en nuestro caso, se requieren condiciones de extracción muy exigentes como incubación con proteinasa K por 48 horas y repurificación adicional mediante columnas.

De esta manera 14 de las 15 muestras procesadas demostraron ser amplificables mediante PCR, con resultados analíticos válidos. La amplificación genómica para VPH, VPH 16 y VPH 18 detectó la presencia del tipo 16 en el 43% de los casos analizados. La validación externa de nuestra serie se realizó mediante la amplificación de líneas celulares de cáncer cervical como las células Hela, la cual lleva insertos de genomas de VPH 18 y células SiHa que tienen incorporado genomas de VPH 16¹⁹. No se detectó presencia de genomas de VPH 18, lo cual puede no ser relevante si pensamos que la serie estudiada es muy baja para inter-

pretar este dato correctamente. Sin embargo, si esto representa datos reales, constituye una observación muy interesante puesto que VPH 16 y 18 tienen similares propiedades oncogénicas. Con el análisis de un mayor número de casos estaríamos en condiciones de establecer si esta observación puede tener connotaciones epidemiológicas en nuestra población y aún más, se podría establecer mediante técnicas de *fingerprinting* si se trata o no de un mismo subtipo de VPH 16. Mediante estos análisis también es posible establecer si la expansión clonal de las células infectadas ocurrió antes o después de la infección, demostrando el rol que puede tener VPH 16 en la progresión tumoral.

Otra observación es que un solo caso resultó ser VPH genérico positivo y VPH 16-18 negativo. Esto pone de manifiesto la importancia de analizar otros genotipos que pueden estar asociados a lesiones de alto grado como los VPH 31, 33 y 35²⁰.

Cabe mencionar que las muestras 14 y 15 corresponden a una pieza quirúrgica del mismo paciente tomadas con un año de diferencia. La primera muestra resultó positiva para VPH 16 y la segunda presentó inhibición, lo cual sugiere que la amplificación genómica por

PCR no depende de las características de la muestra sino de los procedimientos de fijación posteriores a su recolección¹⁸.

Los casos 2 y 10 corresponden a dos piezas quirúrgicas de distinta ubicación tomadas en la misma fecha, correspondientes a una paciente de sexo femenino de 39 años de edad. Ambas muestras fueron positivas para VPH 16, pudiendo sugerir que la infección por VPH podría estar diseminada y no circunscrita a una región específica en el pulmón de esta paciente. No tenemos explicación para el caso que resultó ser VPH negativo y VPH 16 positivo. Al respecto podríamos comentar que se trataría de un falso negativo para VPH, puesto que la banda presente para VPH 16 es bastante intensa. Nosotros creemos que se descarta la posibilidad de un falso positivo para VPH 16 puesto que los controles negativos, que acompañan a la muestra en todo su procesamiento no dan indicios de contaminación.

De acuerdo a las publicaciones existentes a la fecha, VPH está presente en CEP en un rango que va desde un 5 a un 78%¹³. Nuestro hallazgo, que representa una cifra intermedia, ha evaluado sólo casos con la condición "queratinizante" (CEPQ), lo cual hace difícil establecer comparaciones con muchos de los estudios anteriores. Sin embargo, la elección de casos de CEP con la condición de "queratinizantes" se estableció debido a los resultados obtenidos en países asiáticos que han encontrado la presencia de VPH en este tipo de tumores^{12,13}.

Nos parece bastante importante la posibilidad de complementar estos resultados con alguna técnica de detección que permita conservar la arquitectura tisular, de tal manera de analizar el tropismo de VPH sobre tejido epitelial. En este sentido la "hibridación in situ" sería una herramienta que nos permitiría establecer la ubicación histológica de las células positivas en cortes de tejido²¹. A la vez pensamos que el análisis de la expresión de proteínas tardías a través de técnicas inmunohistoquímicas nos permitiría establecer si existe maduración viral en el tejido tumoral, lo cual se contraponen al rol de VPH como agente causal de transformación celular²². La técnica de "microdissección de tejidos", por otra parte, constituye una al-

ternativa metodológica de separación de grupos de células que nos permitiría aislar tejido tumoral y no tumoral adyacente para analizarlo posteriormente con herramientas moleculares²³. Los epitelios bronquiales de individuos fumadores, con o sin lesiones precursoras pueden constituir un foco de estudio en el cual sería interesante saber si VPH puede tener algún rol, junto con el análisis de casos controles. Nuestro estudio no incluyó el análisis de este tipo de muestras.

En definitiva, la presencia de VPH 16 en la serie analizada indicaría que VPH podría estar asociado con la patogenia del CEPQ y justifica el análisis de un mayor número de muestras ampliando el espectro de genotipos de VPH.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- STANLEY M A. Immunobiology of papillomavirus infections. *J Reprod Immunol* 2001; 52: 45-59.
- 2.- HU X, PANG T, GUO Z, PONTEN J, NISTER M, AFINK B G. Oncogene lineages of human papillomavirus type 16 E6, E7 and E5 in preinvasive and invasive cervical squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2001; 195: 307-11.
- 3.- KIM H, SONG E, HWANG T. Higher incidence of p53 mutation in cervical carcinomas with intermediate-risk VPH infection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 98: 213-8.
- 4.- GAARENSTROOM K N, MELKERT P, WALBOOMERS J M, VAN DEN BRULE A J, VAN BOMMEL P F, MEYER C J et al. Human papillomavirus DNA and genotypes: prognostic factors for progression of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 1994; 4: 73-8.
- 5.- TAKAHASHI Y, YAMADE I, NAKAMURA T, AKIYAMA M, HAYASHI Y, ISHIGURO T et al. Infection by human papillomavirus types 6, 11, 16, 18, 31, 33 and 35 of the cervix in Japanese women. *Int J Gynecol Cancer* 1995; 5: 45-8.
- 6.- ASTORI G, MERLUZZI S, ARZESE A, BROSOLO P, DE PRETIS G, MAIERON R et al. Detection of Human Papillomavirus DNA and p53 Gene Mutations in Esophageal Cancer Samples and Adjacent Normal Mucosa. *Digestion* 2001; 64: 9-14.
- 7.- OGURA H, FUKUSHIMA K, WATANABE S. A high prevalence of human papillomavirus DNA in recurrent nasal papillomas. *J Med Microbiol* 1996; 45: 162-6.
- 8.- COOK J R, HILL D A, HUMPHREY P A, PFEIFER J D, EL-MOFTY S K. Squamous cell carcinoma arising in recurrent respiratory

- papillomatosis with pulmonary involvement: emerging common pattern of clinical features and human papillomavirus serotype association. *Mod Pathol* 2000; 13: 914-8.
- 9.- GHEORGHE D C, ARDELEAN C, ANTON G. Virological and immunological aspects in the juvenile laryngeal papillomatosis. *Rom J Virol* 1999; 50: 85-9.
 - 10.- DIPAOLLO J A, POPESCU N C, WOODWORTH C D, ZIMONJIC D B. Papillomaviruses and potential copathogens. *Toxicol Lett* 1996; 88: 1-7.
 - 11.- YANG X, JIN G, NAKAO Y, RAHIMTULA M, PATER MM, PATER A. Malignant transformation of VPH 16-immortalized human endocervical cells by cigarette smoke condensate and characterization of multistage carcinogenesis. *Int J Cancer*. 1996; 65: 338-44.
 - 12.- CHENG Y, CHIOU H, SHEU G, HSIEH L, CHEN J, CHEN C et al. The association of Human Papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking taiwanese women. *Cancer research*, 2001; 61: 2799-803.
 - 13.- MIYAGI J, TSUHAKO K, KINJO T, IWAMASA T, HIRAYASU T. Recent striking changes in histological differentiation and rate of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the lung in Okinawa, a subtropical island in southern Japan. *Clin Pathol* 2000; 53: 676-84.
 - 14.- POPPER H H, WIRNSBERGER G, JUTTNER-SMOLLE F M, PONGRATZ M G, SOMMERS-GUTTER M. The predictive value of Human Papillomavirus (HPV) typing in the prognosis of bronchial squamous cell papillomas. *Histopathology* 1992; 21: 323-30.
 - 15.- MIASKO A, NIKLINSKA W, NIKLINSKI J, CHYCZEWSKA E, NAUMNIK W, CHYCZEWSKI L. Detection of Human papillomavirus in non-small cell lung carcinoma by polymerase chain reaction. *Folia Histochem Cytobiol*. 2001; 39: 127-8.
 - 16.- CLAVEL C E, NAWROCKI B, BOSSEAUX B, POITEVIN G, PUTAUD I C, MANGEONJEAN C C et al. Detection of Human Papillomavirus DNA in bronchopulmonary carcinomas by Hibrid Capture II. *Cancer* 2000; 88: 1347-52.
 - 17.- BAAY M F, QUINT W G, KOUDSTAAL, HOLLEMA H, DUK J M, BURGER M P et al. Comprehensive Study of Several General and Type-Specific Primer Pairs for Detection of Human Papillomavirus DNA by PCR in Paraffin-Embedded Cervical Carcinomas. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 745-7.
 - 18.- KARLSEN F, KALANTARI M, CHITEMERERE M, JOHANSSON B, HAGMAR B. Modifications of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation. *Lab Invest* 1994; 71: 604-11.
 - 19.- MEISSNER J D. Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. *J Gen Virol* 1999; 80: 1725-33.
 - 20.- YOUSEM S A, OHORI N P, SONMEZ-ALPAN E. Occurrence of Human Papillomavirus DNA in primary lung neoplasms. *Cancer* 1992, 69: 693-7.
 - 21.- KAYA H, KOTILOGLU E, INANLI S, EKICIOGLU G, BOZKURT SU, TUTKUN A et al. Prevalence of human papillomavirus (HPV) DNA in larynx and lung carcinomas. *Pathologica* 2001; 93: 531-4.
 - 22.- HEINO P, SKYLDBERG B, LEHTINEN M, RANTALA I, HAGMAR B, KREIDER J W et al. Human papillomavirus capsids expose multiple type-restricted and type-common antigenic epitopes. *J Gen Virol* 1995; 76: 1141-53.
 - 23.- WISTUBA I I, BEHRENS C, MILCHGRUB S, BRYANT D, HUNG J, MINNA J D et al. Sequential molecular abnormalities are involved in the multistage development of squamous cell lung carcinoma. *Oncogene* 1999; 18: 643-50.

Agradecimientos. Los autores agradecen al Dr. Ignacio Wistuba O., Departamento de Anatomía Patológica, Pontificia Universidad Católica de Chile por proporcionar los partidores para PCR utilizados en este estudio.