

Distribución relativa de genotipos de virus papiloma humano en muestras de carcinoma escamoso de laringe

Relative distribution of human papilloma virus in laryngeal squamous cell carcinoma

Mariela Torrente A¹, Loreto Yeomans A², Maritza Abud P³, José Manuel Ojeda F².

RESUMEN

Introducción: La relación entre virus papiloma humano (VPH) y cáncer escamoso de la vía aéreo-digestiva superior está claramente establecida en la literatura.

Objetivo: El objetivo del presente trabajo es conocer la frecuencia de identificación de ADN de VPH y la distribución relativa de genotipos en muestras de carcinoma escamoso de laringe.

Material y método: Se extrajo ADN desde muestras fijadas en formalina e incluidas en parafina, de biopsias de carcinoma escamoso de laringe de pacientes operados en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital San Juan de Dios. La detección de ADN viral se realizó mediante PCR con partidores de consenso MY09/11, y la genotipificación se realizó mediante endonucleasas de restricción RsaI. La calidad de la muestra se controló mediante amplificación de β -globina.

Resultados: Se incluyeron 90 casos. En 24 de ellos (27%) se identificó la presencia de ADN de VPH. Los genotipos más frecuentes fueron VPH18 (7/24), VPH16 (5/24), VPH54 (2/24). En 3 casos no se logró identificar el genotipo. No se detectaron infecciones múltiples.

Conclusiones: La presencia de genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico sugieren que el virus papiloma humano tendría un rol en la etiopatogenia de un subgrupo de pacientes portadores de carcinoma escamoso de laringe.

Palabras clave: VPH, genotipificación, virus papiloma humano.

ABSTRACT

Introduction: Human papillomaviruses (HPV) have been detected in benign and neoplastic laryngeal lesions, with variable frequency (20-60%). These viral agents are proposed as an adjuvant or cofactor in head and neck carcinogenesis because of their oncogenic properties.

Aim: The aim of this study was to identify HPV in laryngeal carcinoma samples and to describe their genotype distribution.

Material and method: Tumor samples from patients with newly diagnosed laryngeal carcinomas were collected, fixed in formalin and paraffin-embedded. HPV genome was identified by use of polymerase chain reaction (PCR) using primers complementary to the conserved region L1 (MY09-11). Genotyping was accomplished by restriction fragment length polymorphism.

Results: 24 of the 90 samples were positive for HPV DNA (27%), all of the samples were positive for human β -globin. The genotypes identified were HPV 16 (5 cases), HPV 18 (7 cases), and HPV 39, 45, 51, 58, 59, 61, and 66 (1 case each).

Conclusions: High-risk HPV genotypes were identified, suggesting a role of human papilloma virus in the etiology of a subgroup of laryngeal squamous cell carcinomas.

Key words: HPV, genotyping, human papilloma virus.

¹ Departamento de Otorrinolaringología, Facultad de Medicina Universidad de Chile, Hospital San Juan de Dios.

² Centro de Oncología Preventiva, Campus Occidente, Facultad de Medicina Universidad de Chile.

³ Departamento de Anatomía Patológica, Hospital San Juan de Dios.

INTRODUCCIÓN

El carcinoma escamoso de laringe constituye aproximadamente 2% de los casos nuevos de neoplasias malignas al año en Estados Unidos¹, y 4.500 personas mueren por esta enfermedad al año. La mayoría de los pacientes son hombres (relación 8:1 entre hombres y mujeres), los factores de riesgo más conocidos son el hábito tabáquico y el consumo de alcohol¹. En los últimos años se ha reconocido el rol del virus papiloma humano (VPH) en el proceso carcinogénico de un grupo de tumores escamosos de la vía aérea digestiva superior. Los VPH son virus icosaédricos de doble hebra de ADN, que contienen aproximadamente 8.000 pares de bases. Su genoma se distribuye en genes de expresión temprana (E) y tardía (L).

Entre los genes de expresión temprana se reconocen los oncogenes virales E6 y E7, cuyas proteínas interfieren con el normal funcionamiento de las proteínas celulares p53 y pRb, respectivamente. De esta forma se pierde el control de la progresión del ciclo celular con la consecuente proliferación descontrolada e inmortalización celular. Esto permite además la acumulación de eventos relacionados con inestabilidad genética que contribuyen a la carcinogénesis².

Entre los genes de expresión tardía cabe destacar L1 cuya secuencia génica posee regiones altamente constantes en los distintos genotipos virales, lo que permite su utilización en los ensayos para identificar la presencia de ADN viral.

A la fecha se han descrito más de 100 tipos distintos de VPH (genotipos), los que se agrupan en genotipos de alto y bajo riesgo oncogénico según su relación epidemiológica con el cáncer cérvico-uterino. Los genotipos de alto riesgo (HR VPH) más frecuentes son VPH 16 y 18, los que se detectan en 60% a 70% de los casos de cáncer de cérvix. Cabe destacar que la distribución relativa de los genotipos de alto riesgo presenta una variación étnico-geográfica³.

En carcinomas invasores de laringe la prevalencia de VPH varía entre 8% y 58,8%⁴⁻¹². Esta dispersión puede explicarse por la diferencia entre técnicas empleadas para la identificación del ADN viral y por la escasa cantidad de pacientes y muestras clínicas incluidas en los estudios. La distribución relativa de genotipos no ha sido estu-

diada en carcinomas escamosos de laringe, sólo hay reportes que incluyen algunos genotipos más prevalentes en poblaciones anglosajonas^{4,13} o donde se entrega la información total para tumores de cabeza y cuello sin detallar por zona anatómica¹⁴. VPH 16 parece ser el más frecuente, al igual que en carcinoma cérvico-uterino.

En publicación previa de nuestro grupo se describen los resultados de un número reducido de pacientes¹². El objetivo del presente trabajo fue evaluar la presencia de ADN de VPH en muestras de cáncer escamoso de laringe, y establecer la distribución relativa de los genotipos identificados incluyendo una casuística mayor.

MATERIAL Y MÉTODO

Material de biopsias

Se incluyeron en el estudio las biopsias de 90 pacientes con diagnóstico de carcinoma escamoso de laringe, tratados en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital San Juan de Dios entre los años 2000 y 2005. De ellos, 30 casos se reportaron previamente¹². Todas las muestras se encontraban fijadas en formalina e incluidas en parafina.

Extracción de ADN

Se realizó extracción de la parafina mediante tratamiento con xilol y etanol. Se sometió a digestión con proteinasa K por 3 horas a 55°C. El pellet resultante se purificó mediante extracción orgánica con una secuencia de fenol, cloroformo y alcohol isopropílico.

Detección ADN de VPH por PCR (MY09/11)

La detección de VPH se realizó usando los partidores de consenso MY09/MY11 que hibridan con regiones genómicas correspondientes al gen L1 de VPH.

El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio incorporado. Se visualizó la banda amplificada de aproximadamente 450 pb en un transiluminador U.V. (Vilber Lourmart), y se fotografiaron las imágenes usando una cámara digital Nikon Coolpix 4500.

Genotipificación de VPH mediante uso de endonucleasas de restricción

La tipificación de los VPH se realizó de acuerdo a la técnica previamente descrita¹², que consiste en digerir con la endonucleasa de restricción Rsa I el producto amplificado por PCR de la región L1. Los patrones de digestión por Rsa I de la mayoría de los VPH son característicos para cada genotipo viral. Esto permite realizar un procedimiento de genotipificación "abierto" a todos los genotipos descritos, y no limitado a los más frecuentes como sería al utilizar hibridación con marcadores específicos.

El producto de digestión fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio incorporado. Posteriormente se visualizaron las bandas digeridas por medio de un transiluminador U.V. (Vilber Lourmart) y se compararon al patrón de las mismas con los estándares obtenidos por Villiers y cols.

PCR para β -globina humana

Para verificar la calidad del ADN obtenido, a cada muestra se le determinó la presencia de β -globina humana mediante PCR.

Análisis estadístico

Los resultados son analizados en forma descriptiva. Se incluyeron todos los pacientes del período

de estudio, es decir, se trabajó con el universo muestral del período.

RESULTADOS

Se incluyeron 90 casos de pacientes portadores de carcinoma escamoso de laringe, cuyas características se observan en la Tabla 1. Se detectó genoma de VPH en 24 de las 90 carcinomas estudiados (27%), 20 casos fueron pacientes de sexo masculino y 4 de sexo femenino. No hubo diferencias significativas con respecto a la presencia viral y edad, hábito tabáquico y estadio tumoral (Tabla 1).

La Figura 1 muestra la presencia de ADN de VPH amplificado mediante PCR usando los partidores MY09/11. Las muestras positivas muestran la presencia de fragmentos de 450 pares de base (bp), el que no se observa en las muestras negativas. Todas las muestras fueron adecuadas para el ensayo ya que permitieron la amplificación del gen de β -globina.

La Figura 2 muestra la presencia de genotipos de VPH en los carcinomas laríngeos estudiados. El perfil de los fragmentos producto de la digestión con la enzima de restricción Rsa1 permite visualizar la presencia de genotipos como VPH18 por su correspondencia con los fragmentos generados utilizando el ADN de células HeLa que contiene ADN de VPH18.

La Figura 3 muestra la distribución de los genotipos de VPH en los carcinomas escamosos.

Tabla 1. Características epidemiológicas de los pacientes incluidos

	VPH + n: 24 (27%)	VPH - n: 66 (73%)	Total n: 90 (100%)
Sexo			
Femenino	4 (17%)	10 (15%)	14 (16%)
Masculino	20 (83%)	56 (85%)	76 (84%)
Tabaco			
Sí	19 (79%)	52 (79%)	71 (79%)
No	5 (21%)	14 (21%)	19 (21%)
Edad (años)			
Rango	29-85	30-86	29-86
Mediana	62	65	65
Estadio			
Inicial (I y II)	7 (29%)	21 (32%)	28 (31%)
Avanzado (III y IV)	17 (71%)	45 (68%)	62 (69%)

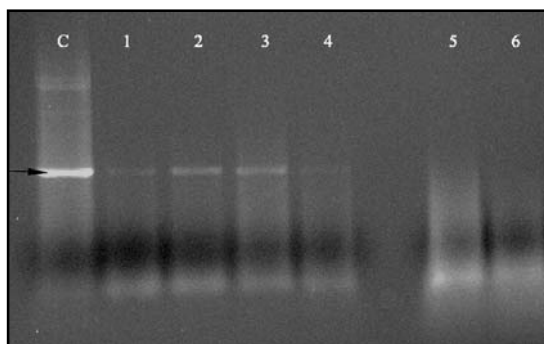


Figura 1. Detección de ADN de VPH en muestras de carcinomas laríngeos correspondientes a 6 casos. Gel de agarosa al 1,5% mostrando la presencia del producto de PCR correspondiente a la región L1 del genoma de VPH usando partidores MY09/11. La flecha indica la banda de 450 bp en el control (C) y en los casos 1 al 4. Los casos 5 y 6 son negativos.

Los genotipos más frecuentes fueron VPH18 (7/24), VPH16 (5/24), VPH54 (2/24). En 3 casos no se logró identificar el genotipo. No se detectaron infecciones múltiples.

DISCUSIÓN

El rol de VPH en la carcinogénesis de los tumores escamosos de la vía aéreo-digestiva superior ha sido claramente establecido en los últimos años, incluso se ha demostrado su rol como factor de buen pronóstico¹⁵.

La literatura reporta una prevalencia en torno al 25% de VPH en tumores de cabeza y cuello, pero esta cifra puede variar entre 8% y 58%. Esto se explica por las diferentes técnicas usadas para la detección viral y por el número de casos incluidos. Sólo tres series reportadas incluyen más de 50 pacientes^{4,13,14}. En la primera de ellas, para un total de 103 pacientes, la prevalencia de VPH fue de 6,8%¹³, pero los autores emplearon PCR selectivo para genotipos VPH 16, 18, 31, 33 y 45; excluyendo de esta forma otros genotipos, por lo cual la prevalencia real de VPH podría estar subestimada. En un segundo estudio se incluyeron 86 casos con una prevalencia de 19% para VPH¹⁴. Finalmente un tercer estudio incluyó 91 casos con una prevalencia de 13%⁴. De un total de 5.046 casos agrupados en un metaanálisis¹⁶, la prevalencia de VPH fue de 24% (IC 21,8-26,3).

En este trabajo escogimos una técnica basada en PCR ya que es el método más sensible. Como partidores utilizamos MY09/11 que corresponden

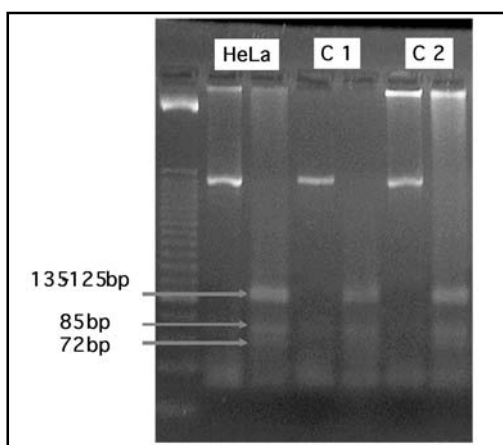


Figura 2. Identificación de genotipos de VPH en muestras de carcinomas laríngeos mediante técnica de endonucleasas de restricción. Gel de agarosa al 1,5% donde se observa el resultado de la digestión del amplificado de L1 con la endonucleasa Rsa1. El primer carril corresponde al patrón de tamaño. Se muestra el resultado del control (HeLa) y de dos casos (1 y 2), para todos ellos el primer carril corresponde al amplificado de L1 sin digerir. El control corresponde a ADN de células HeLa lo que permite identificar la presencia de VPH 18, con bandas en 135-125 bp, 85 bp y 72 bp. En los dos casos incluidos se observa el mismo patrón de bandas que el correspondiente al ADN de células HeLa.

a partidores genéricos y se ha demostrado que amplifican en forma confiable un gran número de genotipos de VPH, incluyendo todos los de alto riesgo¹⁷. La limitación de esta técnica puede ser el tamaño del fragmento a amplificar: 450 bp. Las muestras se encuentran fijadas en formalina lo que fragmenta el ADN y dificulta la extracción de fragmentos de más de 200 bp. Sin embargo, la

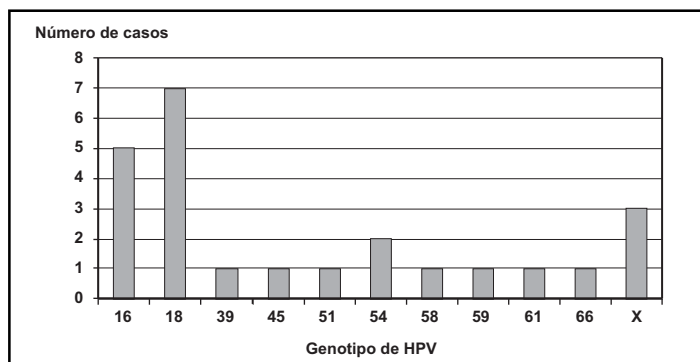


Figura 3. Distribución de genotipos de VPH en carcinomas laríngeos. VPHX: no identificado.

cifra obtenida en este experimento es muy cercana al 25% que reporta el metaanálisis de Kreimer¹⁶.

Con respecto a la distribución de genotipos de VPH en tumores de cabeza y cuello existen pocos reportes, y la mayoría utilizan técnicas que detectan los genotipos de alto riesgo más prevalentes. En nuestra serie llama la atención que el genotipo más frecuente fue VPH18 (7 casos, 33%), al contrario que en otras series publicadas donde el genotipo más frecuente es VPH16 (en nuestra serie corresponde a 5 casos, 24%). Sin embargo, son series donde se incluyen tumores de la vía aéreo-digestiva superior, analizando en conjunto orofaringe, hipofaringe y laringe, lo cual podría tener un efecto en la distribución de genotipos.

La variación en la distribución relativa de genotipos también puede estar determinada por factores étnico-geográficos. En carcinomas escamosos de cuello uterino el genotipo más frecuente a nivel mundial es el VPH 16¹⁸. Sin embargo, al realizar un análisis por continente, los genotipos más prevalentes de VPH pueden presentar variaciones^{18,19}. La prevalencia de VPH16 y VPH18 en carcinomas de cuello uterino en Europa y Norteamérica es semejante (74% y 76% respectivamente); en cambio, en Centro y Sudamérica es más parecida a la de Asia (65% y 67%, respectivamente), siendo la de África de distribución intermedia (70%). Siendo los genotipos de VPH 16 y 18 los más prevalentes en los carcinomas de cuello uterino a nivel mundial, la frecuencia y distribución de los otros genotipos presenta una mayor variación en cuanto a distribución y frecuencia por continentes.

Si entendemos la fuente de infección de la vía aéreo-respiratoria fundamentalmente de origen genital, es comprensible que la distribución de genotipos sea semejante a la del carcinoma cérvico-uterino.

El estudio de la distribución de genotipos también resulta relevante en el contexto de la vacuna profiláctica de VPH. En el comercio están disponibles dos vacunas: CerviraxTM (que protege contra VPH 16 y 18) y GardasilTM (que protege para VPH 6, 11, 16 y 18).

El presente trabajo demuestra la factibilidad de realizar estudios de identificación de VPH en muestras fijadas en formalina e incluidas en parafina en nuestro medio. La frecuencia de identificación viral es similar a lo reportado en la literatura¹⁶. Con respecto a los genotipos identificados, esta serie incluye un número considerable de pacientes con patología tumoral de un solo origen en la vía aéreo-digestiva superior (la laringe) en comparación con otros estudios, lo que consolida la relación etiopatogénica de ciertos VPH en los carcinomas escamosos de laringe.

BIBLIOGRAFÍA

1. MILLION R, CASSISI N, CLARK J. Cancer of the head and neck. In: V.T. De Vita, S. Hellman, and S.A. Rosenberg (eds), *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, pp. 488-590. Philadelphia: J.B. Lippincott Co.; 1989.
2. McKAIG RG, BARIC RS, LOSAN AF. Human papillomavirus and head and neck cancer:

- Epidemiology and molecular biology. *Head Neck* 1998; 20: 250-65.
3. MUÑOZ N, BOSCH X, DE SANJOSE S, HERRERO R, CASTELLSAGUE X, SHAH K ET ALS. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.
 4. GORGOLIS VG, ZACHARATOS P, KOTSINAS A, KYROUDI A, RASSIDAKIS A, IKONOMOPOULOS J ET ALS. Human Papilloma Virus (HPV) is possibly involved in laryngeal but not in lung carcinogenesis. *Hum Pathol* 1999; 30: 274-83.
 5. SMITH EM, SUMMERSGILL KF, ALLEN J, ET ALS. Human papillomavirus and risk of laryngeal cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000; 109: 1069-86.
 6. ALMADORI G, CADONI G, CATTANI P, GALLI J, BUSSU F, FERRANDINA G, ET ALS. Human papillomavirus infection and epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Can Res* 2001; 7: 3988-93.
 7. ATULA S, GRENMAN R, KUJARI H, SYRJÄNEN S. Detection of human papillomavirus (HPV) in laryngeal carcinoma cell lines provide evidence for a heterogeneous cell population. *Eur J Cancer* 1999; 35: 825-32.
 8. VENUTI A, MANNI V, MORELLO R, DE MARCO F, MARZETTI F, MARCANTE ML. Physical state and expresión of human papillomavirus in laryngeal carcinoma and surrounding normal mucosa. *J Med Virol* 2000; 60: 396-402.
 9. BRANDWEIN MS, BILLER H, NUOVO GJ. Analysis of prevalence of human papilloma virus in laryngeal carcinomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1993; 102: 309-13.
 10. LIE ES, KARLSEN F, HOLM R. Presence of human papilloma virus in squamous cell laryngeal carcinomas. A study of thirty-nine cases using polymerasa chain reaction and in situ hybridization. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1996; 116: 900-5.
 11. PÉREZ-AYALA M, RUIZ-CABELLO F, ESTEBAN F, CONCHA A, REDENDO M, OLIVA MR, ET ALS. Presence of HPV 16 sequences in laringeal carcinomas. *Int J Cancer* 1990; 46: 8-11.
 12. TORRENTE M, ABUD S, ABUD M, OJEDA JM. Molecular detection and genotyping of human papillomavirus in laryngeal carcinoma specimens. *Acta Otolaryngol* 2005; 125: 888-93.
 13. FOURET P, MONCEAUX G, TEMAM S, LACOURREYE L, LACAU ST GUILY J. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinomas in nonsmokers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 123: 513-16.
 14. GILLISON ML, KOCH WM, CAPONE RB, SPAFFORD M, WESTRA WH, WU L, ET ALS. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 709-20.
 15. FAKHRY C, GILLISON ML. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2606-11.
 16. KREIMER AR, CLIFFORD GM, BOYLE P, FRANCESCHI S. Human papillomavirus types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 467-75.
 17. QU W, JIANG G, CRUZ Y, CHANG CJ, HO G, KLEIN R, ET ALS. PCR detection of human papillomavirus: Comparison between MY09/11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1304-10.
 18. SMITH J, LINDSAY L, HOOTS B, KEYS J, FRANCESCHI S, WINER R. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int J Cancer* 2007; 121: 621-32.

Dirección: Dra. Mariela Torrente A.
Huérfanos 3255, Santiago
E mail: mtorrente@med.uchile.cl