

## DETECCIÓN MOLECULAR DE LA INFECCIÓN POR VPH EN PACIENTES CON CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

ARTURO CORDERO, ANGELA RUÍZ, DAYAHINDARA VEITÍA, MAIRA ÁVILA, ANDREÍNA FERNANDES, CARLOS COELLO, JOSÉ F MATA, MARÍA CORRENTI

INSTITUTO DE ONCOLOGÍA "DR. LUIS RAZETTI". LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR. INSTITUTO DE ONCOLOGÍA Y HEMATOLOGÍA-MPPS

### RESUMEN

**OBJETIVO:** El consumo de alcohol y tabaco son los principales factores de etiológicos del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; recientemente se ha asociado su desarrollo con la exposición a VPH, por lo que nos hemos propuesto realizar la detección de la infección viral en estos pacientes. **MÉTODO:** Evaluaron 17 biopsias incluidas en parafina, la extracción del material genético se realizó empleando el estuche comercial QIAGEN®; la detección y tipificación viral fue realizada utilizando INNO-LiPA, ambos procedimientos siguiendo las especificaciones de la casa comercial. **RESULTADOS:** El promedio de edad fue  $59,7 \pm 8,68$  años, con predominio del género masculino (82 %), confirmando en todas las muestras el diagnóstico de carcinomas de células escamosas. La laringe y la cavidad oral fueron las localizaciones anatómicas más frecuentes del tumor (59 % y 35 % respectivamente). El hábito tabáquico se observó en 76 % de los pacientes y el consumo de alcohol en 82 %. La infección viral fue detectada en el 88 % de los casos, el VPH-16 se observó en el 73 %. **CONCLUSIÓN:** Los resultados obtenidos son comparables con los de diversas investigaciones, revelando que la presencia de VPH se asocia con la localización anatómica del tumor, específicamente con los tumores de laringe ( $P < 0,05$ ), mostrando además que el 86,6 % de los casos VPH-positivos se encontraban en estadio avanzado, lo que podría sugerir que la infección viral sería un importante factor de riesgo en el desarrollo y progresión del carcinoma de laringe.

**PALABRAS CLAVE:** VPH, carcinoma, cabeza y cuello, INNO-LiPA, células escamosas.

### SUMMARY

**OBJECTIVE:** The alcohol and snuff are the main etiological factors of the head and neck squamous cell carcinoma; however recently its development has been associated with exposure to HPV, so we intend to make the detection of the viral infection in patients with this diagnostic. **METHOD:** We analyzed 17 biopsies embedded in paraffin of patients diagnosed with squamous cell carcinoma of head and neck was evaluated. The extraction of genetic material was performed using commercial kit QIAGEN®; the detection and viral typing was performed using INNO-LiPA, both procedures following the specifications of commercial house. **RESULTS:** The mean age was  $59.7 \pm 8.68$  years old, with a predominance of male (82 %), and carcinomas of the most common squamous cell. The larynx and the oral cavity were the most common anatomic sites of tumor (59 % and 35 % respectively). The smoking was observed in 76 % of the patients and the alcohol at 82 %. The viral infection was detected in 88 % of cases, HPV-16 was observed in 73 %. **CONCLUSION:** The results obtained are comparable with those of various investigations, revealing that the presence of HPV is associated with the anatomical location of the tumor, specifically with laryngeal tumors ( $P < 0.05$ ), in addition to showing the 86.6 % of HPV positive cases were in advanced stage, which could suggest that the viral infection would be an important risk factor in the development and progression of laryngeal carcinoma.

**KEY WORDS:** HPV, carcinoma, head and neck, INNO-LiPA, squamous cell.

---

Recibido: 22/01/2017 Revisado: 12/04/2017

Aceptado para publicación: 20/05/2017

---

Correspondencia: Dr. Arturo R Cordero G. Instituto de Oncología "Dr. Luis Razetti" Calle real de Cotiza, San José Caracas. Tel: 0412-2929020 E-mail:

---

## INTRODUCCIÓN

Los cánceres de cabeza y cuello (CCC) representan el 3,5 % de todos los tumores malignos en los EE.UU.<sup>(1)</sup> y Europa<sup>(2)</sup>, pero en muchas partes del mundo como India, sureste de Asia y Brasil son mucho más comunes siendo en conjunto la 5ª/6ª malignidad más frecuente del mundo<sup>(3,4)</sup>. En Venezuela representan el 2 % de todos los tumores malignos, de acuerdo con datos del anuario de mortalidad del Ministerio del Poder Popular para la Salud (2011)<sup>(5)</sup>; son tumores que presentan una alta tasa de mortalidad asociada así como una deficiente calidad de vida por lo que se han convertido en un importante problema de salud pública en las últimas décadas<sup>(6)</sup>.

Los principales factores etiológicos son el consumo de alcohol y tabaco porque aproximadamente las tres cuartas partes de estos son atribuidos al uso de estas sustancias<sup>(7)</sup>; presentándose la mayoría de los casos en pacientes masculinos de mayores de 40 años de edad; se ha descrito también múltiples comorbilidades asociadas a menudo con fumar y beber<sup>(8)</sup>, de igual manera se han implicado en la etiología de estos tumores factores ocupacionales<sup>(9)</sup>, mala higiene bucal<sup>(10)</sup>, bajo estatus socioeconómico, entre otros factores. En los últimos años se han desarrollado diversas investigaciones que indican un aumento en la incidencia en mujeres y población joven, los cuales se han asociado con la exposición al virus papiloma humano (VPH)<sup>(11)</sup>.

El VPH comprende un gran grupo de más de 100 tipos virales pertenecientes a la familia *Papillomaviridae*<sup>(12)</sup> que pueden infectar el epitelio estratificado de la piel y mucosa del tracto aerodigestivo superior o ano-genital, lo que puede dar lugar a la formación de verrugas genitales y papilomas laríngeos así como ciertos tipos de cáncer<sup>(13)</sup>. Se conocen más de 180 genotipos, de los cuales aproximadamente 150 afectan

al ser humano y se describe como una de las infecciones de transmisión sexual más comunes en el mundo<sup>(14)</sup>. En un metaanálisis internacional se ha hallado que el VPH genotipo 16 ha sido detectado entre el 80 % y 90 % de los cánceres de orofaringe, 62 % de los cáncer de cavidad oral y 69,2 % de los cáncer de laringe<sup>(15)</sup>, mostrando que podría existir una relación entre estos tumores y la infección viral. Breamer y col. (2010)<sup>(16)</sup> proponen que estos valores de incidencia pueden variar considerablemente dependiendo de la población estudiada, localización del tumor primario y a metodología empleada para la detección viral.

Resultados de investigaciones realizadas en los últimos años ha permitido a los autores predecir que para el año 2020 la incidencia anual de los cánceres oro-faríngeos VPH positivos podría ser tan alta como la de cáncer cervical lo cual ilustra un incremento importante de esta infección, especialmente en términos de relevancia socioeconómica<sup>(15)</sup>.

En vista de la demostrada asociación del VPH como factor de riesgo en la génesis de los CCECC, sobretodo en edades más tempranas, nos hemos propuesto detectar la prevalencia infección por VPH en pacientes con carcinoma de cabeza y cuello en un grupo de ellos tratados en el Instituto Oncológico “Dr. Luis Razetti” y evaluar su papel como factor de riesgo en la génesis tumoral.

## MÉTODO

### Material biológico

Se evaluaron 17 tumores de pacientes con diagnóstico histopatológico de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello atendidos en el Instituto de Oncología Dr. “Luis Razetti” entre el período 2003-2008. Se obtuvieron tumores incluidos en bloques de parafina a partir de los cuales se realizaron los ensayos de biología

molecular. La información clínica se obtuvo a partir de las historias médicas.

### Extracción de material genético

El bloque de parafina fue tallado para exponer el tejido que posteriormente fue cortado e incubado con 1 500  $\mu$ L de xileno, se centrifugó a 20 000 g durante 5 min. Seguidamente se realizó un lavado con 1 500  $\mu$ L de etanol absoluto y fue centrifugado a 20 000 g por 5 min. Posteriormente el tejido fue secado y se procedió a la extracción del ADN, empleando para ello el estuche comercial QIAmp DNA mini kit (QIAGEN®) siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Las biopsias fueron incubadas con buffer ATL a 65 °C durante toda la noche, posteriormente se agregó buffer AL y se incubó a 70 °C por 10 min. Se agregó etanol absoluto y se transfirió el lisado a una columna. Se realizaron lavados con los buffers W1 y W2. La elución se realizó con 200  $\mu$ L de buffer de elución. Los ADN obtenidos fueron guardados a -80 °C hasta su uso.

### Detección de VPH

La detección de VPH se realizó con el estuche comercial *INNO-LiPA Genotyping Extra (Innogenetics)*, siguiendo las especificaciones de la casa comercial, el cual permite la detección específica de 28 genotipos de VPH. La prueba se basa en una PCR en la que se amplifica un fragmento de 65 pb de la región L1 del genoma viral usando los iniciadores biotinilados SPF10. Los amplicones biotinilados son posteriormente hibridados con oligonucleótidos inmovilizados de forma paralela en tiras de nirtocelulosa. Posterior a la hibridación y a lavados astringentes, se agregó el conjugado de estreptavidina y el revelado se realizó con fosfatasa alcalina. La incubación con el cromógeno BCIP/NBT lleva a la formación de un precipitado púrpura en los casos en los que se formen híbridos y los resultados son visualmente interpretados

### Análisis estadísticos

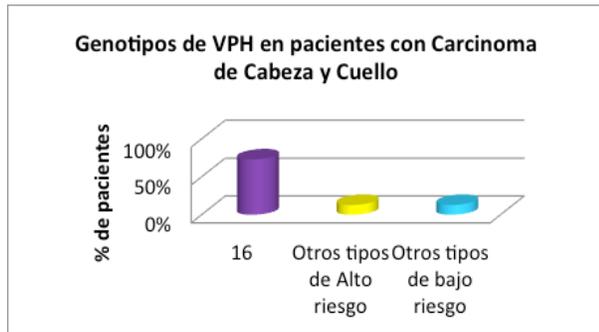
La relación entre la infección viral con el desarrollo, persistencia y progresión del este tipo de cáncer; así como su relación con los hábitos de los pacientes fueron estudiadas mediante una prueba de Chi cuadrado empleando el paquete estadístico SPSS V2.0. La significancia estadística fue considerada para valores de  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

El promedio de edad fue de  $59,7 \pm 8,86$  años (rango 44-78) con predominancia del género masculino (82 %). El hábito tabáquico estuvo presente en 76 % de los pacientes evaluados, mientras que el consumo de alcohol se observó en el 82 %. En cuanto a la localización del tumor primario, se pudo notar que la laringe fue el sitio más frecuente, seguido de la cavidad oral y la orofaringe (59 %, 35 %, 6 % respectivamente). El 70 % de los pacientes se encontraba en estadio avanzado de la enfermedad (estadio IV) mientras que el 6 % se encontraba estadios I y el 12 % en estadio III.

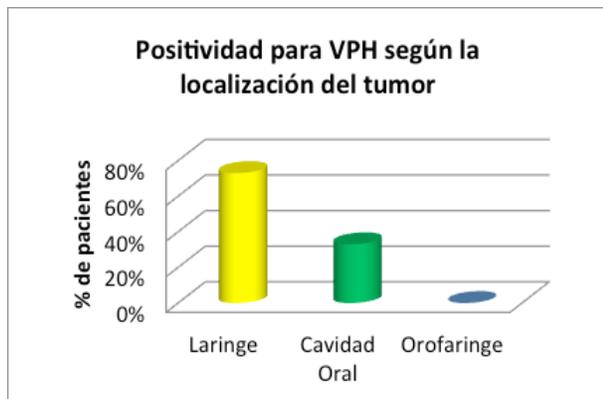
Al realizar la detección de VPH se obtuvo que el 88 % de los pacientes resultaron positivos para la infección viral, siendo el genotipo 16 el más frecuente (73 %), mientras que el 26 % restante correspondió otros genotipos virales presentes (genotipos 6, 33 y 56) (Figura 1).

De los pacientes fumadores, el 77 % presentaba el genoma de VPH, con un 70 % de infección por el genotipo 16 ya sea en forma de infección única, o con los otros genotipos detectados. De igual manera, de los casos positivos para VPH el 86,6 % se encontraban en estado avanzado (III y IV). La laringe fue la localización anatómica con mayor positividad para VPH, seguido de la cavidad oral (73 % y 33 % respectivamente), en el caso de la orofaringe



**Figura 1.** Genotipos de VPH detectados en pacientes con carcinoma de cabeza y cuello.

el genoma viral no pudo ser detectado (Figura 2). Se observó una relación estadísticamente significativa entre la localización anatómica del tumor primario y el genotipo de VPH detectado ( $P=0,048$ ).



**Figura 2.** Positividad para la infección viral según la localización anatómica del tumor

## DISCUSIÓN

Los carcinomas de cabeza y cuello engloban una gran diversidad de neoplasias con diferencias

en su incidencia, forma clínica de presentación, progresión de la enfermedad, enfoque terapéutico y pronóstico. Son tumores relativamente frecuentes y en la mayoría de los casos se presentan en estadios avanzados de la enfermedad. La región de la cabeza y el cuello es extraordinariamente compleja, con una enorme variedad de neoplasias, cada una con aspectos etiológicos característicos, comportamientos biológicos variables, impactos funcionales y respuestas al tratamiento<sup>(17,18)</sup>. A pesar de la diversidad que ha sido descrita para estos tumores, todos comparten ciertas características comunes como lo son predominancia en el género masculino y aparición en mayores de 40 años<sup>(19)</sup>. Esto puede apreciarse en la población evaluada, la cual estuvo conformada por un 82 % de pacientes varones, con una edad promedio que sobrepasa los 50 años. En cuanto a la localización anatómica del tumor primario se observó que la laringe y la cavidad oral fueron las más frecuentes, de igual manera la mayoría de los tumores se encontraban en estadios avanzados (estadio III y IV). Estos resultados coinciden con los descritos por Funk y col. (2001)<sup>(19)</sup> quienes describen que el 90 % de los tumores de cabeza y cuello corresponden a carcinoma de células escamosas, siendo el carcinoma de la cavidad oral el más frecuente (32 %) presentándose la mayoría de ellos en estadio avanzado de la enfermedad. En cuanto a los factores de riesgo se observó que el hábito tabáquico y alcohólico fueron también características compartidas por la mayoría de los pacientes, todos estos datos son similares a los obtenidos por otros investigadores tanto a nivel mundial, como en Venezuela<sup>(20,21)</sup>.

En los últimos años se han realizado diversas investigaciones en las que se relaciona el desarrollo del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello con la infección por VPH<sup>(22)</sup>. Es importante resaltar que la epidemiología de estos tumores ha mostrado un cambio dramático en las pasadas décadas, con un incremento en la

incidencia de la infección viral a nivel mundial desde 25 % en los años 70's, 28 % en los 80's, 57 % para los 90's y a principio de los 2000 han surgido reportes que van desde 68 % a 93 %<sup>(23)</sup>. Según nuestros resultados la infección por VPH estuvo presente en el 88 % de los casos evaluados mediante hibridación reversa, siendo el genotipo 16 el más frecuente (73 %) ya sea en forma de infección única o con otros genotipos de bajo o alto riesgo oncogénico, según datos obtenidos en pacientes venezolanos, en los que se evaluó la infección viral empleando INNO-LiPA, se reportó un 66,7 % de positividad para VPH, en cuanto al genotipo viral, el VPH-16 fue detectado con mayor frecuencia<sup>(24)</sup>. De igual manera, Koskinen y col. (2003)<sup>(25)</sup> reportaron 61 % de positividad para VPH en pacientes con CCECC, siendo el genotipo 16 el más frecuente. Según Breamer y col. (2010)<sup>(16)</sup>, la gran mayoría de los tumores de cabeza y cuello VPH positivos presentan este genotipo viral (VPH-16), ya sea de forma única, co-infección con otros genotipos de alto riesgo o de infección mixta con genotipos de bajo riesgo, y que estas diferencias reportadas a nivel mundial se debe al número y tipo de muestra evaluada, y a las técnicas empleadas para realizar la detección viral.

Recientes datos epidemiológicos y experimentales han vinculado a la infección con VPH (específicamente 16 y 18) con la patogénesis del CCECC, los cuales han sido descritos con una supervivencia notablemente mayor. El VPH-16, de alto riesgo oncogénico, ha sido reportado en el 90 % de los casos, encontrándose de forma integrada en el 48 % y episomal en el 35 % de estos tumores<sup>(26)</sup>. Se ha demostrado de igual forma que la persistencia de la infección viral con genotipos de alto riesgo juega un papel importante en el riesgo de carcinoma orofaríngeo<sup>(27)</sup>, así como en el resto de las áreas que conforman el tracto aerodigestivo superior. Se ha reportado también que la infección por VPH en estos tumores no está restringida a la orofaringe, sino

que puede presentarse igualmente en cánceres de laringe y cavidad oral; lo cual se puede ver reflejado en la investigación realizada Kreimer y col. (2005)<sup>(28)</sup> quienes reportaron que 23,5 % de los carcinomas de la cavidad oral y 24 % de los carcinomas laríngeos analizados en su investigación eran VPH positivos. Aunque todas las investigaciones aquí mostradas establezcan una relación entre la infección viral y el CCECC, es de suma importancia resaltar que al igual que en carcinoma de cuello uterino la sola infección por VPH no es suficiente para la génesis tumoral, porque es necesaria la presencia de una serie de cofactores que ayudan a la progresión de la malignidad del epitelio afectado, entre los que se encuentran la conducta sexual, la respuesta inmune del paciente y la susceptibilidad genética, la edad, la exposición a cancerígenos como lo son el alcohol y el tabaco e incluso se ha mencionado la presencia de otras infecciones de transmisión sexual como por ejemplo *chlamydia* y herpes virus<sup>(29)</sup>.

En la muestra evaluada se observó una relación estadísticamente significativa entre la infección viral y la localización anatómica del tumor primario, específicamente con los tumores de laringe ( $P=0,048$ ), lo que coincide con trabajos previos realizados por Deng y col. (2014)<sup>(30)</sup> en cuya investigación se observó una relación entre el VPH y la localización tumoral así como con la diferenciación de los mismos, sugiriendo que la infección por VPH sería un importante factor de riesgo en el desarrollo y progresión del carcinoma laríngeo.

## REFERENCIAS

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2012;62:10-29.
2. Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin D. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer.* 2002;38:99-166.
3. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates

- of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*. 2010;46:765-781.
4. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61:69-90.
  5. Anuario de Mortalidad del Ministerio de Poder Popular para la Salud de la República Bolivariana de Venezuela. Año 2011. Disponible en: URL:www.mpps.gob.ve.
  6. Kupferman M, Myers J. Molecular biology of oral cavity squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am*. 2006;39(2):229-247.
  7. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: Pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. *J Nat Cancer Inst*. 2007;99:777-789.
  8. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris R. Head and neck cancer. *Lancet*. 2008;371(9625):1695-709.
  9. Boffetta P. Epidemiology of environmental and occupational cancer. *Oncogene*. 2004;23(38):6392-6403.
  10. Moreno-López L.A. Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: A case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncol*. 2000;36:170-174.
  11. Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: Changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Clin Proceedings*. 2008;83:489-501.
  12. Steben M, Duarte E. Human Papillomavirus infection: Epidemiology and pathophysiology. *J Gyn Oncol*. 2007;107:S2-5.
  13. Abogunrin S, Di Tanna G, Keeping S, Carroll S, Iheanacho I. Prevalence of human papillomavirus in head and neck cancer in European populations: A meth-analysis. *BMC Cancer*. 2014;14:968-980.
  14. Stalin E, y Castillo J. Detección del virus del papiloma humano (VPH) por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC*. 2004;29(75):1.
  15. Tribius S, Hoffmann M. Human Papillomavirus infection in head and neck cancer. *Dtsch Arztlbl Int*. 2013;110(11):184-190.
  16. Braemer C, Von Buchwald. The role of human papillomavirus in head and neck cancer. *MPMIS*. 2010;118:510-519.
  17. Li W, Thompson CH, O'Brien CJ, McNeil EB, Scolyer RA, Cossart YE, et al. Human papillomavirus positive predict favorable outcome for squamous carcinoma of the tonsil. *ELSEVIER*. 2003;1606:553-558.
  18. Fonseca E. Factores de riesgo e historia natural del cáncer de cabeza y cuello. En: Cruz Hernandez JJ, editor. *Cáncer de cabeza y cuello (Monografías de Oncología Médica 2005)*. You & Us Ediciones. 2005.p.3-14.
  19. Funk GF, Karnell LH, Robinson RA, Zhen WK, Trask DK, Hoffman HT. Presentation, treatment, and outcome of oral cavity cancer: A national cancer data base report. *Head Neck*. 2001;24(2):165-180.
  20. McMahan S, Chen A. Head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2003;22:21-24.
  21. Veitía D, De Guglielmo Z, Ávila M, Liuzzi J, Correnti M. Detección de VPH y expresión de p53 en carcinoma de cabeza y cuello. *Rev Venez Oncol*. 2009;21(3):123-131.
  22. De Petrini M, Ritta M, Schena M, Chiusa L, Campisi P, Giordano C, et al. Head and neck squamous cell carcinoma: Role of the human papillomavirus in tumor progression. *The New Microbiol*. 2006;29:25-33.
  23. Näsman A, Attner P, Hammarstedt L, Du J, Eriksson M, Giraud G, et al. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: An epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer*. 2006;125:362-366.
  24. Veitía D, Liuzzi J, Ávila M, De Guglielmo Z, Prado Z, Prado Y, Correnti M. Human Papillomavirus detection in Head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Medical Science*. 2014;8:475-482.
  25. Koskinen W, Wei R, Leivo I, Mäkitie A, Bäck L, Kontion R, et al. Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int. J. Cancer*. 2003;107:401-406.
  26. Ramshankar V, Krishanmurthy A. Human Papillomavirus and head and neck cancers- Role and relevance in clinical management. *Indian J Surg Oncol*. 2013;4(1):59-66.
  27. Chaturvedi A. Epidemiological and clinical aspects of HPV in head and neck cancers. *Head Neck Pathol*. 2012;6:S16-S24.
  28. Kreimer A. Human Papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: A systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(2):467-475.
  29. Premali G, Gonzalez A, Villareal J, Percoco T, Pietrocino P, Aguilera L. Virus de Papiloma

Humano, visión actual en biomedicina. Rev Adm. 2005;LXII(6):213-224.

30. Deng J, Vehara T, Maide H, Hasegana M, Matayoshi S, Kiyura A, et al. Epstein Barr Virus and Human Papillomavirus infections and Genotype distribution in head and neck cancers. Plos One. 2014;9(11):e113702.