

## DETECCIÓN DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO EN LESIONES CANCEROSAS ORALES EN LA CIUDAD DE CÓRDOBA

**Dolores A. Bustos, Jorge V. Pavan, Silvia E. Carricart, Angel D. Talavera,  
Dante Secchi, Victoriano Carrica, René L. Panico y Héctor Gendelman.**

Instituto de Virología "Dr. J.M.Vanella" de la Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba (U.N.C.)

Cátedra A de Estomatología de la Facultad de Odontología, U.N.C.

Cátedra de Anatomía Patológica. Facultad de Odontología. U.N.C.

\*Cátedra de Bacteriología y Virología Médicas, Facultad de Ciencias Médicas, U.N.C.

Santa Rosa 1090. Alberdi 5000 Córdoba, Argentina

### Resumen

El cáncer oral es un proceso que involucra diferentes factores etiológicos y mecanismos, a la luz de los conceptos actuales de cocarcinogénesis. Existen evidencias histológicas y de hibridación que sugieren la participación del virus papiloma humano (HPV) en la carcinogénesis oral. La Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba recibe aproximadamente el 20% de los pacientes con lesiones cancerosas orales en esta ciudad. En el período comprendido entre los años 1992-1997 fueron examinadas 1950 biopsias, 4,77% (93/1950) de ellas fueron diagnosticadas como neoplasias malignas, de éstas el 79,57% (74/93) fueron carcinomas. Treinta y tres carcinomas orales (44,6%; 33/74) fueron seleccionados al azar e incluídos en el estudio. Se incluyeron 33 extendidos celulares de pacientes con mucosa oral normal. Los materiales fueron estudiados por microscopía óptica y por la técnica de hibridación "in situ" para la detección del DNA de HPV. Los datos fueron analizados mediante el test de chi cuadrado. La prevalencia de HPV entre las 33 muestras casos estudiada fue 27,27%, 9/33 fueron positivos para HPV en condiciones no estrictas. Un material fue positivo en condiciones estrictas para HPV 16, un carcinoma verrugoso. En las muestras de mucosa oral normal no se detectó HPV. Entre los HPV positivos, 3/9 (33,33%)

fueron carcinomas espinocelulares y 5/9 (55,56%) carcinomas verrugosos. Uno fue un melanoma. El carcinoma verrugoso fue la neoplasia asociada con más frecuencia a la infección por HPV ( $x^2 = 20,5$ ; con un nivel de confianza del 95%); lo que podría sugerir un mayor papel del HPV en la patogénesis del carcinoma verrugoso. La presencia viral encontrada en lesiones cancerosas refuerza la naturaleza multicausal del cáncer oral. El HPV es una circunstancia que incrementa la probabilidad de malignidad, y que cuando se reduce, disminuye la frecuencia de cáncer.

**Palabras Claves:** Virus Papiloma humano - Prevalencia - Cáncer oral - Carcinoma verrugoso.

### Abstract

Oral cancer is a process that involves different etiological factors and mechanisms in the light of current view of viral cocarcinogenesis. Evidence from histology and DNA hybridization studies suggests that HPV is engaged in oral carcinogenesis. The Pathology Laboratory of the Dentistry School, National University of Córdoba, admits approximately 20% of all patients with cancerous lesions in this city.

In the January 1992-December 1997 lapse, we examined 1950 biopsies with oral lesions, 4.77% (93/1950) of which were

malignant neoplasms, 79.57% (74/93) were oral carcinomas. Thirty-three oral carcinomas (44.6%; 33/74) were selected at random and included in this study. 33 cells smears of normal oral mucosa of controls individuals were included. They were analyzed by conventional light microscopy and an in situ hybridization technique for the detection of HPV. Data were analyzed with chi square test. The prevalence of HPV among the 33 cancer samples studied was 27.27%, 9/33 tested positive for HPV in low stringent conditions. Only one was positive in high stringent condition for HPV16, a verrucous carcinoma. No HPV-DNA was detected in cells smears of controls. Among the HPV positive, 3/9 (33.33%) were squamous carcinomas and 5/9 (55.56%) were verrucous carcinomas. Only one was a melanoma. Verrucous carcinoma was the carcinoma most associated with the HPV infection ( $x^2 = 20.5$ ; 95% level of confidence). This would indicate a major role of HPV in the pathogenesis of verrucous carcinomas. The viral prevalence found in cancerous lesions reinforces the concept of heterogenic natures of oral cancer. HPV is a circumstance that increase the probability of malignancy, and when reducing, diminish the frequency of cancer.

**Key words:** Human papillomavirus. Prevalence- Oral cancer - Verrucous carcinoma.

### Introducción

La proliferación celular es considerada como un proceso de microevolución, caracterizado por cambios que secuencialmente emancipan a un clon de células somáticas de los mecanismos que regulan su crecimiento. Factores químicos, físicos o biológicos pueden producir un daño genético o epigenético, alterando la regulación de los puntos críticos del ciclo celular (11, 15).

En los países en desarrollo, el cáncer de la mucosa oral se encuentra entre las cinco más

frecuentes neoplasias con una mortalidad equiparable a la observada en el cáncer de cérvix, con quien comparte características histológicas y epidemiológicas (1).

En la provincia de Córdoba, entre los años 1975 y 1995, la tasa promedio anual de mortalidad por cáncer bucal fue 1,48 cada 100.000 habitantes (9). En esta provincia, en la región sud este, la contaminación del agua con sales arsenicales ha expuesto a la población a una enfermedad, el hidro arsenismo crónico regional endémico (HACRE), con una elevada incidencia de carcinomas orales (3).

El virus papiloma humano (HPV) es una especie viral antigua, que ha coevolucionado con su huésped, y está asociada a procesos de proliferación celular. La especie incluye mas de 77 tipos virales (4), algunos de los cuales poseen oncoproteínas que pueden inactivar la función de proteínas celulares regulatorias del ciclo celular (11, 12).

Las infecciones por HPV en la cavidad oral tradicionalmente corresponden a cuadros patológicos bien definidos como (I) hiperplasia focal epitelial (HPV-13 y HPV-32), (II) papilomas escamosos, (III) condilomas acuminados, (IV) verruca vulgaris (los últimos tres asociados a HPV-6 y HPV-11); todas lesiones sin potencial de malignización. La participación del HPV en carcinomas de la cavidad oral, es un tema controvertido (2, 8). Diferentes autores no coinciden en la proporción de carcinomas orales infectados con HPV (7). A pesar de estas discrepancias, estudios preliminares realizados en nuestro medio señalan algunas evidencias de la posible participación del HPV en el cáncer de la mucosa oral (10).

El presente trabajo como un aporte al conocimiento de factores biológicos que pueden alterar el ciclo celular dirige su mirada hacia las proliferaciones celulares de la mucosa oral diagnosticadas en una provincia con un riesgo particular para cáncer oral, a fin de conocer la circulación e importancia patogénica del HPV.

## Material y Métodos

En la ciudad de Córdoba, la Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba recibe aproximadamente el 20% de los pacientes con lesiones cancerosas orales en esta ciudad. En el período comprendido entre los años 1992-1997 fueron examinadas 1950 biopsias, 93 de ellas fueron diagnosticadas

como neoplasias malignas (4,77%), de éstas 74 fueron carcinomas (79,57%) (Tabla I). Para el diseño experimental de este trabajo fueron seleccionados al azar el 44,59% (33/74) del total de carcinomas observados en el período: grupo casos. El grupo control estuvo constituido por 33 extendidos de mucosa oral normal de individuos homologables al grupo problema en edad, sexo y hábitos.

Tabla I

Número de biopsias, neoplasias malignas, carcinomas y carcinomas verrugosos estudiados entre los años 1992-1997 en la Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba.

AÑO	BIOPSIAS	NEOPLASIAS MALIGNAS	CARCINOMAS	CARCINOMAS VERRUGOSOS
1992	287	11	10	4
1993	345	11	9	2
1994	326	21	13	4
1995	327	26	21	5
1996	368	13	12	0
1997	297	11	9	2
<b>Total</b>	<b>1950</b>	<b>93</b>	<b>74</b>	<b>17</b>

### Diagnóstico clínico.

El diagnóstico clínico fue realizado por el Servicio de la Cátedra A de Estomatología de la Facultad de Odontología, U.N.C. Se obtuvo de los pacientes el libre consentimiento con conocimiento de causa según las normas internacionales para la investigación biomédica en humanos (Ginebra 1982). En una ficha se consignaron los datos personales, clínicos y epidemiológicos (edad, sexo, domicilio, localización de la lesión, evolución de la lesión, antecedentes de lesiones papilomatosas, antecedentes de consumo de tabaco, alcohol, y presencia de prótesis).

### Estudio histopatológico

Los materiales clínicos fueron recolectados por biopsia de la lesión por escisión parcial o total de la misma, fijados en formalina neutra tamponada durante 6 h e incluidos en parafina. Para el estudio histopatológico de las lesiones, se utilizaron cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina, obtenidos del material biopsiado. Las muestras correspondientes a mucosa oral normal se obtuvieron por cepillado de la mucosa y la fijación se realizó en etanol-ácido acético 3:1 (v/v) durante 15 min. y luego en etanol 100% 10 min.

Los estudios histopatológicos de los 66 materiales clínicos correspondieron:

Grupo casos: (n=33) fueron diagnosticados como lesiones neoplásicas: 10 carcinomas verrugosos, 22 carcinomas espinocelulares infiltrantes, 1 melanoma.

Grupo control (n=33) todos con diagnóstico de citología normal.

### DetECCIÓN Y TIPIFICACIÓN VIRAL

La obtención de sondas de ADN-HPV biotiniladas, como así también la detección y tipificación viral mediante la técnica de hibridación "in situ" se realizaron en el Instituto de Virología "Dr. J.M. Vanella" de la Facultad de Ciencias Médicas, U.N.C. Bacterias *Escherichia coli* DH 5 competentes fueron transformadas con diferentes clones de DNA plasmídico que contenían secuencias nucleotídicas tipo específicas de DNA viral (HPV 6, HPV 11, HPV 16 y HPV 18). Las bacterias transformadas fueron seleccionadas, el DNA plasmídico de los clones bacterianos aislados fue extraído y separado del DNA cromosómico bacteriano, para luego ser digerido con las enzimas de restricción utilizadas en su clonado. La migración de los segmentos según su peso molecular en un gel de agarosa permitió identificar el DNA plasmídico obtenido. El DNA tipo específico de HPV purificado fue marcado con biotina a fin de ser utilizado para identificar secuencias de HPV presentes en materiales problemas. Para este objetivo se procedió según la técnica de "nick translation" obteniéndose fragmentos marcados de 800-600 pares de bases (13). El DNA biotinilado fue purificado a través de una cromatografía en Sephadex G50 (6), para ser utilizado en la solución de hibridación. Se hibridó en condiciones no estrictas con una mezcla de sondas HPV6/HPV11 (10% formamida) a fin de detectar la especie virus papiloma humano. Para tipificar se utilizaron sondas específicas HPV6/HPV11, HPV 16 y HPV18 en condiciones estrictas (50% formamida).

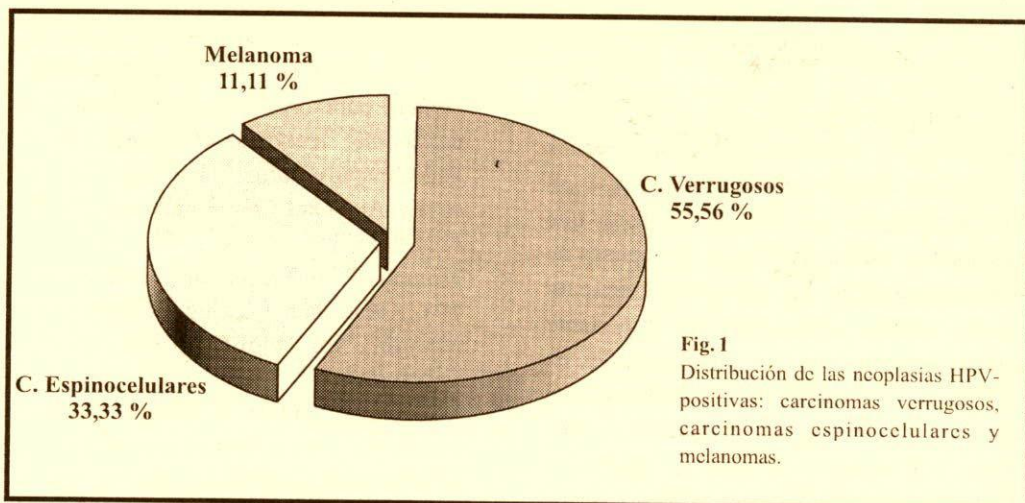
### Análisis estadístico

Para estudiar la significación de variables categóricas y a fin de conocer la existencia y la frecuencia de una relación entre ellas, se utilizó la prueba de chi cuadrado ( $\chi^2$ ). Este análisis permitió medir el grado de asociación entre la presencia de HPV y diferentes carcinomas orales.

### Resultados

El 27,27% (9/33) de las muestras casos fue positiva para HPV, correspondiendo 55,56% (5/9) a carcinomas verrugosos, 33,33% (3/9) a carcinomas espinocelulares infiltrantes y a un melanoma (Fig. 1). En el grupo control ninguna muestra (0/33) fue positiva para HPV. La prevalencia de la infección en los carcinomas verrugosos fue 50% (5/10) y en los carcinomas espinocelulares 13,6% (3/22); diferencia estadísticamente significativa ( $\chi^2=20,5$ ; nivel de confianza 95%). La tipificación realizada para HPV-6/11, HPV-16 y HPV-18 dio como resultado una muestra positiva para HPV-16 en un carcinoma verrugoso.

Las edades promedio de los pacientes con carcinomas HPV positivos y HPV negativos fue similar (63 años). En la muestra cáncer HPV-positiva el virus fue el factor de riesgo más importante; solo un paciente era fumador y ninguno ingería más de 60g de alcohol por día. En la muestra cáncer HPV-negativa, sin embargo, el tabaco y el alcohol fueron los factores de riesgo más importantes. Sólo un paciente, con carcinoma HPV positivo, provino de una zona de HACRE. La localización y evolución de la lesión evaluada como sobrevida a los 5 años, no fueron diferentes entre los carcinomas HPV-positivos y aquellos HPV-negativos.



### Discusión

La prevalencia de la infección por HPV en lesiones cancerosas de la mucosa oral refuerza la evidencia de una probable participación viral en un porcentaje de los carcinomas orales. Estudios similares llevados a cabo por algunos autores coinciden con estos hallazgos (14, 17, 19). En la mucosa oral normal no se detectaron ácidos nucleicos virales, a diferencia de lo postulado por Miller C. S. y col(7).

Un sólo material (1/9) de los carcinomas HPV-positivos, un carcinoma verrugoso, fue reactivo en condiciones estrictas de hibridación para HPV-16; considerando que se tipificó únicamente para HPV 6/11, HPV 16 y HPV 18. Diferentes tipos virales han sido identificados en lesiones orales tales como HPV 1, 2, 4, 6, 7, 11, 16, 18, 32 y 57 (16). Es probable que los tipos virales que infectan la mucosa oral sean diferentes de aquellos encontrados en la mucosa anogenital, como así también la historia natural de la infección (5, 18).

El carcinoma verrugoso, neoplasia de crecimiento lento y de baja agresividad que representa en nuestro estudio aproximadamente el 23% de los carcinomas de la mucosa bucal, fue la neoplasia asociada con más frecuencia a la infección (50%). Existen

antecedentes de la presencia del HPV en este tipo de lesiones, como así también en carcinomas laríngeos y penianos, reforzando la participación del HPV en la etiología de neoplasias de características y comportamiento similares ubicadas en epitelios de diferentes órganos (4).

La significación biológica de la asociación HPV y cáncer oral se encuentra en la alteración de puntos críticos del control del ciclo celular, a través de las oncoproteínas virales (E6 y E7), las que forman un complejo con las proteínas celulares que regulan negativamente la proliferación celular (proteínas de los genes oncosupresores p53 y la p105 RB) y neutralizan su función (11,12). Sin embargo, el elevado porcentaje de lesiones cancerosas negativas para HPV descritas en este trabajo hace suponer que el comportamiento viral en estas lesiones es diferente al observado en el cáncer de cuello, en donde la mayor parte de las lesiones son reactivas para HPV.

La historia natural de la infección oral por HPV no está totalmente aclarada, como tampoco el papel que los factores biológicos, químicos y físicos pueden representar en un proceso que se desarrollará en múltiples etapas, y en donde ninguno de los factores necesarios antes mencionados es suficiente para originarlo.

### Conclusión

Para comprender los mecanismos oncogénicos es necesario identificar los pasos génicos individuales que emanciparon a un clon de células de los mecanismos que regulaban su crecimiento. Los oncogenes de HPV, capaces de modificar el comportamiento celular, parecen desempeñar un importante papel protagónico en los carcinomas orales, en particular en los carcinomas verrugosos. La existencia de fenómenos epigenéticos tales como carcinógenos físicos y químicos interactuando con oncogenes virales y genes oncosupresores, en el juego complejo de la multicausalidad, demuestran en un importante número de lesiones orales HPV negativas la necesidad de una mejor comprensión de la progresión tumorigénica.

### Agradecimientos

Agradecemos la asistencia técnica de Cristina Bertoldi. Este proyecto ha sido subsidiado por SECYT UNC y CONICOR.

### Referencias.

1. American Cancer Society. Cancer statistics. *A Cancer Journal for Clin.* 43:7-20, 1993.
2. Brandwein M, Zoithlin J, Nuovo GC, MacConnell P, Bodian C, Urkon M, Billor H. HPV detection using "hot start" polymerase chain reaction in patient with oral cancer: a clinicopathological study of 64 patients. *Mod Pathol.* 7:720-727, 1994.
3. Carrica V, Panico R, Talavera D, Femopase F, Gendelman H, Lanfranchi H. Estudio comparativo de lesiones precancerosas bucales en zonas arsenicales y no arsenicales. *Abstract. J Dent Res.* 74:5, 1995.
4. De Villiers E M. HPV-Types in Human Disease. In: Gross G G, and von Krough, editors. *Human papillomavirus infection in dermatovenereology.* 1997.
5. Kashima H. K., M. Kutcher, T. Kessiss, L. S. Levin, E. M. de Villiers, and K. V. Shah. Human papillomavir in squamous cell carcinoma, leukoplakia, lichen planus, and clinically normal epithelium of oral cavity. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 99:55-61, 1990.
6. Maniatis T., E. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Ed. Cold Spring Harbor Laboratory.
7. Miller C.S., and D. K. White. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 82:57-68, 1996.
8. Miller C.S., M. S. Zouss, D. K. White, K. Lexington, and V. Venezuela. Detection of HPV DNA in oral carcinoma using polymerase chain reaction together with in situ hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 77:480-486, 1994.
9. Morelato R., P. Belardinelli, S. López de Blanc. Tasa de mortalidad por tumores bucales en la Pcia. de Córdoba, período 1975-1995. *Abstract. J Dent Res.* 77:5, 1998.
10. J.Pavan, D.A. Bustos, S. Carricart, A.D. Talavera, R. L. Panico, D. Secchi, V. Carrica, H. Gendelman, y S. Sileoni. Presencia del Virus Papiloma Humano en lesiones proliferativas de la mucosa oral. *Patología (Mexico) Vol.35:* 299-304. 1997
11. Pavan J, Coranti M, Sileoni S. Virus Oncógenos Humanos, Nuevos Aportes. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas Vol.53 (1):* 37-44, 1995.
12. Pavan J, Gualandi F, Rimessi P, Corallini A, Barbanti Brodano G. Genes oncosupresores, nuevas perspectivas para la investigación en cáncer humano. *Medicina (Buenos Aires)* 54: 163-168. 1994
13. Righby P., M. Dieckmann, C. Rhodes, and P. Berg. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol.* 113:237.

14. Shindoh M., Y. Sawada, T. Kohgo, A. Amemiya, and K. Fujinaga. Detection of human papillomavirus DNA sequences in tongue squamous cell carcinoma utilizing the polymerase chain reaction method. *50:167-169, 1992.*
15. Stanbridge E., and P. Nowell. Origins of Human Cancer. Revisited. Meeting Review. *63:867-874, 1990.*
16. Syrjanen S. HPV-Related squamous cell tumors of the airways and esophagus: epidemiology and malignant potential. In: Gross G. G., and von Krough, editors. Human papillomavirus infection in dermatovenereology. 181-199, 1997.
17. Syrjanen S. M., K. J. Syrjanen, and R. P. Haponen. Human Papillomavirus DNA sequences in oral precancerous lesions and squamous cell carcinoma demonstrated by in situ hybridization. *J Oral Pathol. 17:273-278, 1998.*
18. Syrjanen K., S. Syrjanen, M. Lamberg, S. Pyrhonen, and J. Nuutinen. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg. 12:418-423, 1983.*
19. Zeuss M. S., C. S. Miller, and D. R. White. Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 71:714-720, 1991.*