

## ONCOGENES E6-E7 DE LOS PAPILOMAVIRUS HUMANOS DE ALTO RIESGO DETECTADOS POR PCR EN BIOPSIAS DE PENE INCLUIDAS EN PARAFINA

Guerrero I<sup>1</sup>, Mejía R<sup>1</sup>, Velazco R<sup>1</sup>, Misad O<sup>2,4</sup>, Pow-Sang M<sup>3,4</sup>.

<sup>1</sup>Unidad de Biología Molecular-Centro de Investigación en Cáncer Maes-Heller.

<sup>2</sup>Departamento de Patología, Instituto de Enfermedades Neoplásicas "Dr. Eduardo Cáceres Graziani".

<sup>3</sup>Departamento de Urología, Instituto de Enfermedades Neoplásicas "Dr. Eduardo Cáceres Graziani".

### RESUMEN

La alta prevalencia del papilomavirus humano (PVH), referida a nivel mundial, en lesiones genitales de ambos sexos, el rol del varón como reservorio pasivo del virus, y el incremento de la mortalidad por cáncer genital en la mujer en nuestro país, motiva la detección y correlación de los oncogenes de los PVH de alto riesgo con la neoplasia de pene. Informamos de diez casos de biopsias de carcinoma escamoso de pene, incluidos en parafina, los cuales fueron investigados para la presencia de los oncogenes E6-E7 de PVH de alto riesgo, utilizando cebadores tipo específico para los PVH-16 y 18, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El 40% de los casos mostró un producto de amplificación ADN E6-E7 de los PVH estudiados, correspondiendo el 75% de ellos a detección simple por PVH-18 y el 25% presentó detección mixta ADN E6-E7 del PVH-16 y 18 simultáneamente. El producto de amplificación fue sometido a comprobación por análisis de restricción específico. La prevalencia obtenida de los oncogenes E6-E7 de los PVH de alto riesgo, usando un método tan sensible como la PCR, apoya el rol de estos virus en el proceso de carcinogénesis de la neoplasia de pene.

Palabras clave: Oncogenes, papillomavirus humano, pene, reacción en cadena por polimerasa.

### ABSTRACT

The high prevalence of human papillomavirus (HPV) reported worldwide in genital lesions of both sexes, the role of males as passive reservoirs of the virus and the increased mortality due to genital cancer among women in our country led to the detection and correlation of high risk HPV oncogenes with penile neoplasia. We reported ten cases of penile squamous cell carcinoma, paraffin-embedded, which were tested for the presence of HPV high risk E6-E7 oncogenes, using type-specific primers for HPV-16 and HPV-18 by means of polymerase chain reaction (PCR). The 40% of the cases showed an amplification product of E6-E7 DNA of the HPV studies, corresponding 75% of them to simple detection by HPV-18 and the 25% presented mixed detection by E6-E7 DNA of HPV-16 and HPV-18 simultaneously. The amplification product was submitted to restriction analyses. The prevalence of E6-E7 oncogenes of the high risk HPV-DNA obtained using the highly sensitive method of PCR, support the role of this virus in the process of carcinogenesis of the penile neoplasia.

Key words: Oncogenes, papillomavirus, human, penis, reverse transcriptase polymerase chain reaction.

### INTRODUCCIÓN

Los papilomavirus humanos son virus ADN, transmitidos sexualmente, y tienen como reservorio los genitales tanto de la mujer como del hombre. Son epiteliotrópicos y mucosotrópicos, asociados con varias lesiones mucosas, epiteliales y cutáneas en humanos<sup>1</sup>.

La infección por PVH está estrechamente relacionada al carcinoma genital, especialmente al cáncer cervical en la mujer cuando empieza la actividad

sexual a temprana edad, cofactor predisponente en la epidemiología de la carcinogénesis y lesiones precancerosas<sup>2</sup>, así como cuando sus compañeros sexuales presentan verrugas localizadas en el pene<sup>3</sup>.

Las características morfológicas específicas para la neoplasia intraepitelial de pene (NIP) han sido estudiadas en compañeros sexuales de mujeres con condiloma genital o NIP; los resultados histológicos demostraron NIP en el 93% de los casos, y el ADN de los PVH, potencialmente oncogénicos, fueron detectados en el 75% de los pacientes con NIP grado I, en el 93% con grado II y en todos los pacientes con NIP grado III, esta progresión observada es similar a la

Correspondencia: Ivonne Guerrero. Instituto Nacional de Salud. Calle Cápac Yupanqui 1400, Lima 11, Perú. Apartado postal 471. Telf.: (0511) 4719920 - Fax: (0511)4710179. Email: iguerrero@inen.sld.pe

neoplasia intraepitelial cervical<sup>4</sup>.

La identificación del epitelio aceto-blanco, para el diagnóstico de la infección por PVH del pene, fue informada como no significativa entre pacientes con presencia o ausencia de dicho epitelio y los estudios moleculares por PCR<sup>5</sup>, siendo aún considerada la penoscopia como una prueba de baja sensibilidad para diagnosticar infección latente por PVH.

El potencial oncogénico de los PVH varía considerablemente en los más de 100 genotipos identificados. Los PVH 6 y 11 son generalmente asociados con lesiones benignas como el condiloma genital o los papilomas laríngeos y han sido esporádicamente asociados con malignidades genitales. Los PVH, particularmente los tipos 16 y 18, pueden ser efectores carcinogénicos en una variedad de malignidades del tracto genital bajo en el humano. Los PVH han sido estudiados en biopsias de pene empleando métodos moleculares como *dot blot*, *southern blot* e hibridación *in situ*<sup>6,7</sup>, siendo la reacción en cadena de la polimerasa la metodología de más alta sensibilidad para detectar el genotipo viral<sup>8</sup>.

El diagnóstico temprano de las infecciones por papilomavirus en el hombre resulta beneficioso y decisivo para disminuir o "controlar" el reservorio pasivo del virus considerando la vía de transmisión sexual y, por ende, los órganos genitales responsables de la diseminación de este agente causal de la neoplasia de cuello uterino y probablemente de la neoplasia de pene. Por lo cual nos propusimos detectar regiones E6-E7 de lectura abierta correspondientes a los oncogenes de los PVH de alto riesgo 16 y 18, en carcinoma de células escamosas del pene, mediante la PCR y utilizando cebadores tipo específico a estos genes.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

El material biológico del estudio estuvo constituido por diez biopsias, de tejido incluido en parafina, de carcinoma escamoso del pene, obtenidas de pacientes atendidos en el Instituto de Enfermedades Neoplásicas "Dr. Eduardo Cáceres Graziani".

**EXTRACCIÓN DE ADN-PVH**

Los cortes de tejido parafinado de 5 micrómetros de espesor fueron desparafinados con xilol y tratados con proteinasa y detergente. Por la extracción orgánica con fenol-cloroformo y precipitación con etanol se obtuvo ADN celular y viral. Durante estos pasos se manipuló controles conocidos negativos de extracción para PVH<sup>9</sup>.

**REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

La mezcla de reacción de la PCR fue realizada empleando cebadores tipo específicos para las secuencias E6-E7 de los PVH-16 y 18 respectiva-

mente<sup>9,10</sup> y sometida a treinta ciclos de amplificación constituidos por repeticiones de un minuto de denaturación a 94°C, un minuto de hibridación a 55°C, y un minuto de polimerización a 72°C. La mezcla de reacción utilizada fue resultante de un estudio piloto de estandarización de condiciones de estringencia y concentración de ácido nucleico de los casos estudiados.

El análisis molecular se realizó sobre geles de agarosa de alta resolución, teniendo en cada corrida electroforética un marcador de peso molecular para segmentos específicos de ADN. Se consideró un caso positivo cuando se observó una banda definida correspondiente al producto de amplificación conocido del PVH-16 y/o 18. Los productos de amplificación positivos fueron sometidos a análisis de restricción específico para comprobar cada segmento y los subproductos de fragmentación analizados respectivamente.

El gen de la β-globina humana fue usado como control de calidad del ADN extraído. La línea celular Hella se usó como control positivo para PVH-18 y control negativo para PVH-16. La línea celular Siha como control positivo para PVH-16 y control negativo para PVH-18.

**RESULTADOS**

El grado histológico del carcinoma escamoso correspondió a siete bien diferenciados, dos moderadamente diferenciados y uno pobremente diferenciado.

Todos los casos presentaron un producto de

Figura 1. Identificación de papiloma virus humano de alto riesgo. M(marcador de peso molecular) PVH-18 (1,3,4,7), PVH-16 (6), Negativo (2,5).

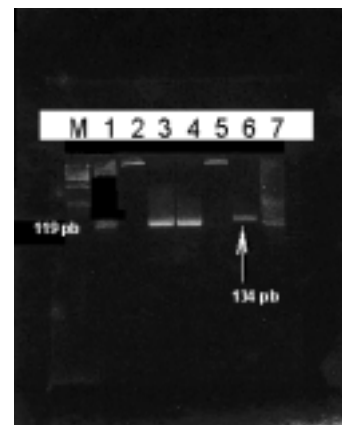


Tabla 1. Frecuencia del PVH positivo en carcinoma escamoso del pene.

PVH	N	%
Positivo	04/10	40,0
DS18	03/04	75,0
DD16/18	01/04	25,0

DS18: detección simple a PVH-18, DD16/18: detección doble a PVH-16 y 18 en el mismo paciente.

amplificación al gen de la  $\beta$ -globina humana, lo cual fue requisito indispensable para proceder al estudio de detección molecular del PVH. Detectamos oncogenes E6-E7 de los papilomavirus humano estudiados en el (40%) de los casos, en tres de ellos se demostró detección simple al tipo 18, y sólo en uno detección doble a los dos tipos 16 y 18 simultáneamente (Figura 1, tabla 1).

Dos de los tres casos positivos a PVH-18 correspondieron histológicamente a carcinomas bien diferenciados y uno a pobremente diferenciado. Mientras que en el único caso moderadamente diferenciado se detectó simultáneamente oncogenes de los dos tipos de papilomavirus humano de alto riesgo estudiados "16 y 18" (Tabla 2).

Tabla 2. Oncogenes E6-E7 PVH-16 y 18 y grado histológico del carcinoma de células escamosas del pene.

Oncogenes	Grado histológico		
	BD	MD	PD
E6-E7 PVH-16	00	01*	00
E6-E7 PVH-18	02	01*	01

BD: bien diferenciado, MD: moderadamente diferenciado, PD: pobremente diferenciado. \* resultados del mismo paciente.

El análisis de restricción de cada producto de amplificación respectivo a los tipos detectados nos mostró un patrón de fragmentación de subproductos confirmatorio de los PVH-16 y/o 18 observado en los cuatro casos positivos.

## DISCUSIÓN

Desde que los papilomavirus humanos fueron detectados en tejidos procedentes de carcinoma de pene hasta la fecha, los hallazgos informan fuertes evidencias que han permitido involucrarlo en la etiología de esta neoplasia. Particularmente nuestro estudio, constituido por una serie pequeña de biopsias de carcinoma de células escamosas del pene, nos mostró la presencia de los oncogenes de los PVH de alto riesgo en una frecuencia similar a la que se informa en casuísticas más grandes<sup>11</sup>. Cuando comparamos la frecuencia del tipo viral caracterizado en nuestra serie con otros informes<sup>12</sup> para los PVH 16 y 18, nosotros observamos inversamente una mayor frecuencia para el tipo 18 que para el 16 con respecto a su hallazgo, quizás debido al tamaño de nuestra muestra.

La reacción en cadena de la polimerasa, instrumento molecular de alta sensibilidad como fue informado desde 1993<sup>13</sup>, empleando cebadores genéricos de la región tardía del genoma de los PVH, nos permite amplificar un amplio espectro de ellos, mientras que en nuestro estudio la amplificación con oligonucleótidos de la región temprana tipo-

específico está restringida a un número limitado de genotipos especialmente aquellos de alto potencial oncogénico como los tipos 16 y 18 capaces de inducir el desarrollo de la neoplasia genital. La sensibilidad de la detección del ADN por la PCR en nuestro estudio fue de  $10^{-5}$ , lo cual equivale aproximadamente  $10^{-6}$  copias por célula<sup>10</sup>, sensibilidad considerablemente mayor que el southern blot e hibridación *in situ*.

Conociendo que la PCR puede amplificar cantidades pequeñas de ADN y que es necesario por tanto prevenir la ocurrencia de resultados falsos positivos, debido a la contaminación, nosotros informamos que la concordancia entre los productos de amplificación detectados de ADN-PVH y el análisis de restricción de los mismos se pudo observar en el cien por ciento de los casos positivos, lo cual pudo ser correlacionado con la concordancia para tipos específicos de PVH entre los productos de amplificación post PCR y los resultados de southern blot descritos antes<sup>14</sup>.

Por lo tanto, podemos afirmar al respecto que, el polimorfismo de los fragmentos obtenidos por análisis de restricción contribuye con la sensibilidad del procedimiento en la confirmación del tipo de PVH detectado en los productos de amplificación post-PCR obtenidos del ADN extraído de material biológico incluido en parafina, lo cual favorece el estudio retrospectivo de la infección por papilomavirus humano en casuísticas mayores de carcinoma de células escamosas del pene.

Finalmente, la frecuencia detectada de oncogenes de los PVH de alto riesgo en esta neoplasia apoya su rol en el proceso de oncogénesis del carcinoma escamoso del pene, y nos sugiere el despistaje de la infección por papilomavirus humano en varones aparentemente sanos, lo cual podría ser importante en la prevención de la neoplasia genital en portadores sexualmente activos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Morales O, Pinedo T, Guerrero I, Estrada H, Rubiños J, Pariona J, et al. Diagnóstico citológico, colposcópico e histológico de la infección del cuello uterino por PVH. *Act Cancer* 1997; 2: 43-54.
- Buckley JD, Harris RW, Vessey MP, Williams PT. Case control study of the husbands of women with dysplasia or carcinoma of the cervix uterine. *Lancet* 1981; 2: 1010-4.
- Campion MJ, Singer A, Clarkson PK, McCance DJ. Increased risk of cervical neoplasia in consort of man with penile condyloma acuminata. *Lancet* 1995; I: 943-6.
- Aynaud O, Ionesca M, Barrassp R. Penile intraepithelial neoplastic. Specific clinical features correlate with histologic and virologic findings. *Cancer* 1994; 74: 1762-7.
- Mazzatenta C, Andreassi L, Biagioli M, Ricci S, Ratti G. Detection and typing of genital papillomaviruses in men with a single polymerase chain reaction and type specific DNA probes. *J Am Ac Derm* 1993; 28(51): 704-10.
- Schneider A, Meinhardt G, Kirchmayr R, Schneider V. Prevalence of human papillomavirus genomes in tissue from the lower genital tract as detected by molecular in situ hybridization. *Int J Gyn Path* 1991; 10(1): 1-14.

7. **Costa S, Syrjanen S, Vendra C.** Detection of human papillomavirus infections in the male sexual partners of women attending in STD clinic in Bologna. *Int J STD AIDS* 1992; 3: 338-46.
8. **Kataoka A, Claesson U, Hansson BG, Eriksson M, Lindh E.** Human papillomavirus infection of the male diagnosed by Southern blot hybridization and polymerase chain reaction: comparison between urethra samples and penile biopsy samples. *J Med Virol* 1991; 33(3): 159-64.
9. **Guerrero I.** Aplicaciones de la reacción en cadena de la PCR y enzimas de restricción en la detección de virus oncogénicos. *Manual de Práctica UBM*, 1995.
10. **Shimada M, Fukushima M, Mukai H, Kato I, Nishikawa A, Fujinaga K.** Amplification and specific detection of transforming generegion of human papillomavirus 16,18 and 33 in cervical carcinoma by means of the polymerase chain reaction. *Jpn J Cancer Res* 1990; 81: 1-5.
11. **Barrasso R, De Brux J, Croissant O, Gérard O.** High prevalence of papillomavirus-associated penile intraepithelial neoplasia in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *New Engl J Med* 1987; 317: 916-23.
12. **Iwasawa A, Kumamoto Y, Fujinaga K.** Detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in penile carcinoma by polymerase chain reaction and in situ hybridization. *J Urol* 1993; 149(1): 59-63.
13. **Saiki RK, Scharf S, Faloona F.** Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-4.
14. **Wiener JS, Effert PJ, Humphrey PA, Yu L, Liv ET, Walther PJ.** Prevalence of human papillomavirus types 16 and 18 in squamous cell carcinoma of the penis: a retrospective analysis of primary and metastatic lesions by differential polymerase chain reaction. *Int J Cancer* 1992; 50(5): 694-701.