

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA**



**INFECCIONES POR PAPILOMAVIRUS HUMANOS (VPH) 16/18
EN PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR EN MEXICO**

Por

JOSÉ ISAÍAS BADILLO ALMARAZ

Como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

Marzo, 2014

**INFECCIONES POR PAPILOMAVIRUS HUMANOS (VPH) 16/18
EN PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR EN MEXICO**

Comité de Tesis

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Director de Tesis

Dr. Moisés Armides Franco Molina
Secretario

Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Vocal

**... “cuando la llama de la fe se acaba y los doctores no hallan la causa
de su mal, señoras y señores...” SERRAT**

**... “esperábamos la luz y he aquí la oscuridad
esperábamos resplandores y andamos en tinieblas...”**

ISAIAS. 59:9

“los que me odian y me aman no permitirán que me descuide”

Proverbio mexicano

MI JURAMENTO

JURO...

POR HIGÍA Y ESCULAPIO,

POR APOLO MÉDICO

POR EL GRANDE Y MISERICORDIOSO

POR EL MANITÚ DE LAS VERDES PRADERAS

POR EL DIOS DE LOS CRISTIANOS Y DEMÁS,

ABSTENERME DE COMETER

INSTRUIDO EN EL CALMÉCAC,

CUALQUIER PECADO CAPITAL

QUE TRUNQUE MI CAMINO

HACIA EL WALHALLA...

YA SEA:

1. CIENCIA SIN HUMANISMO

2. CONOCIMIENTO SIN CARÁCTER

3. RIQUEZA SIN TRABAJO

4. PLACER SIN CONCIENCIA

5. POLITICA SIN PRINCIPIOS

6. COMERCIO SIN MORAL

7. CULTO SIN SACRIFICIO

EN CONSECUENCIA SÉAME DADO

SÍ A ESTE JURAMENTO FUERE FIEL

EL GOZAR DE MI VIDA Y DE MI ARTE

SIEMPRE CELEBRADO ENTRE LOS HOMBRES

MAS SÍ LO QUEBRANTO Y SOY PERJURO

QUE UN HADO FUNESTO ME PERSIGA...

PELIS...!

CIRX...!!

GUESÍ...!!!

GERMO...!!!!

...!!!!!

AGRADECIMIENTOS

Mi reconocimiento y agradecimiento a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, Directora de este laboratorio por el apoyo recibido, y su dirección científica; a el Dr. Pablo Zapata Benavides por su incansable y atinada orientación en todo momento y circunstancia como hombre de ciencia que es; a Santiago Saavedra Alonso “Chago”, por los incontables problemas técnicos que me ayudó a resolver, al apoyo de la Dra. Diana Zamora Ávila, al apoyo irrestricto de la Dra. Diana Reséndez Pérez, sin olvidar el empuje del compañero MC Edgar Manilla, temiendo finalmente olvidar a otras personas de este laboratorio que participaron en este libreto.

A mi asesor externo el Dr. Rafael Herrera Esparza, quién despertó mi interés en el trabajo del laboratorio y la investigación y ha sido piedra angular en mi formación, orientándome desde los laboratorios de la Unidad de Biología Experimental de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

A Vero, por sus expresiones “Luisescas” como ¿”a que te mandé”?.....”y el papel de la academia”?...etc.

En fin a todos ustedes que pudieron alentarme.

ÁREA DE TRABAJO

Los trabajos del presente estudio se realizaron primordialmente en el laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Cristina Rodríguez Padilla.

ÍNDICE

Sección	Página
ÍNDICE DE TABLAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Generalidades del cáncer.....	3
2.2. Virus y cáncer.....	5
2.3. Cáncer de pulmón.....	6
2.4. Epidemiología.....	7
2.5. Oncovirus y cáncer pulmonar.....	8
2.6. Detección de DNA de VPHs.....	9
2.7. Taxonomía de papilomavirus.....	10
2.8. Patogenia.....	12
2.9. Oncoproteína E6.....	18
2.10. Oncoproteína E7.....	22
2.11. Expresión de genes tardíos.....	24
2.12. Respuesta del huésped a la infección por VPH.....	26
3. JUSTIFICACIÓN.....	30
4. HIPÓTESIS.....	31
5. OBJETIVOS.....	32

6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
6.1. Recolección de muestras.....	33
6.2. Extracción de DNA genómico.....	34
6.3. Detección de secuencias de VPH mediante PCR.....	35
6.4. Detección de genomas de los VPHs en el DNA genómico.....	35
6.5. Detección de VPHs tipo 16 y 18.....	36
6.6. Amplificación simultánea del gen específico E6 de diversos tipos de VPHs.....	36
6.7. Electroforesis.....	37
6.8. Secuenciación.....	37
6.9. Hibridación in situ.....	38
6.10. Estrategia experimental.....	39
7. RESULTADOS.....	40
7.1. Presencia de secuencias de VPH tipos 16 y 18 en el DNA genómico extraído de las muestras de tejidos pulmonares.....	40
7.2. Presencia de DNA de VPHs en muestras de cáncer pulmonar confirmada por hibridación <i>in situ</i>	45
8. DISCUSIÓN.....	49
9. CONCLUSIONES.....	53
10. BIBLIOGRAFÍA.....	54
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	61
ANEXOS.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Programa para la MPCR diseñado para dirigir la amplificación simultánea del gen específico de E6 de los VPH's tipo 6, 11, 16, 18, 31, 33, 52 y 58.....	37
Tabla 2. Control de calidad de la MPCR para el gen específico de E6 de los VPH's tipo 6, 11, 16, 18, 31, 33, 52 y 58 y especificación de los amplicones esperados.....	43
Tabla 3. Hallazgos clínicos.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Taxonomía de los papilomavirus (PVs).....	11
Figura 2. La organización circular del genoma de los VPHs.....	12
Figura 3. Áreas de metaplasia escamosa del epitelio respiratorio.....	13
Figura 4. Receptores y moléculas señalizadoras de membrana.....	14
Figura 5. Vías citoplásmicas a través de patrones de tráfico y vía endocítica utilizada por el VPH.....	15
Figura 6. Ciclo replicativo del papilomavirus humano.....	16
Figura 7. Funciones de las oncoproteínas E6/E7 y sus interacciones que tienden a la inmortalización celular.....	22
Figura 8. Funciones de las oncoproteínas E6/E7 y su sinergia que tiende a la inmortalización celular.....	24
Figura 9. Factores de riesgo asociados a la progresión tumoral por el VPH	29
Figura 10. Productos de PCR de las muestras de pacientes con cáncer pulmonar y otras patologías pulmonares, así como de las líneas celulares SiHa y HeLa, usando “primers” específicos para β -globina.....	40
Figura 11. Productos de PCR de las muestras de pacientes con cáncer pulmonar y otras patologías pulmonares, así como de la línea celular SiHa, usando “primers” específicos GP5+/GP6+.....	41
Figura 12. Productos de PCR de las muestras de pacientes con cáncer pulmonar y otras patologías pulmonares, utilizando “primers” específicos para VPH 16.....	42
Figura 13. Productos de PCR de las muestras de pacientes con cáncer pulmonar y otras patologías pulmonares, utilizando “primers” específicos para VPH 18.....	42
Figura 14. Productos de MPCR de las muestras de pacientes con cáncer pulmonar y otras patologías pulmonares.....	44

Figura 15. Secuenciación de muestras representativas positivas a VPH 16/18.....	45
Figura 16. Hibridación <i>in situ</i> positiva a VPH 16, mediante sondas Pan-PathR contrateñida con metilgreen.....	46
Figura 17. Hibridación <i>in situ</i> positiva a VPH 16 en adenocarcinoma, mediante sondas Pan-PathR sin contratinción.....	46
Figura 18. Biopsia pulmonar de adenocarcinoma. HyE (40X).....	47
Figura 19. Biopsia pulmonar (carcinoma epidermoide). HyE (40X).....	47

RESUMEN

Los papilomavirus humanos (VPHs) son virus DNA de doble cadena, con tropismo sobre los epitelios y, los genotipos considerados de alto riesgo están asociados con diversos tipos de cáncer. El genoma de papilomavirus ha sido detectado en carcinomas pulmonares en diversos países alrededor del mundo incluyendo México, sin embargo la prevalencia no esta determinada. En este estudio examinamos la frecuencia de VPH 16/18 de alto riesgo, en tejidos de cáncer broncogénico y de otras enfermedades pulmonares en una población mexicana. Analizamos 39 especímenes de pacientes con cáncer broncogénico y 20 muestras de otras patologías respiratorias para detectar DNA de VPH 16/18 mediante PCR, usando los “primers” GP5+/GP6+, posteriormente fueron genotipificados mediante un segundo juego de “primers” específicos para identificar VPH 16/18 sometiendo a secuenciación algunas muestras seleccionadas de las que resultaron positivas. Nuestros resultados muestran positividad para VPH 16/18 en 16 (41%) de las 39 muestras de cáncer broncogénico y solamente en 2 (10%) de las muestras control. El VPH más frecuentemente detectado fue el tipo 16, siendo positivo en 15 (38.46%) de las muestras y solamente un (2.56%) caso positivo a VPH 18.

Adicionalmente nosotros realizamos una hibridación in situ (ISH) para confirmar la presencia de tales VPH 16/18 en estas patologías, encontrando la presencia de DNA de estos VPH en 13 (81%) de las 16 muestras analizadas concordando con los resultados obtenidos mediante PCR. Demostramos una mayor prevalencia de infección por VPH 16 en adenocarcinomas en comparación con carcinomas epidermoides de pulmón. Estos resultados sugieren que la infección por VPH puede estar asociada al desarrollo de cáncer pulmonar. Sin embargo estudios a futuro son necesarios para aclarar el papel que desempeña la infección por VPH en la carcinogénesis pulmonar.

Palabras clave: VPH, Cáncer broncogénico, México

ABSTRACT

Background: Human papillomavirus (HPVs) is an epitheliotropic, double-stranded DNA virus, and its high-risk genotypes are associated with human cancer. The papillomavirus genome has been detected in lung carcinomas in certain places around the world, including Mexico; however, the prevalence of this is unclear. In this study, we examine the frequency of high-risk HPV 16/18 in lung cancer tissues from a Mexican population. **Results:** Thirty-nine lung cancer specimens were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) using HPV GP5+/GP6+ primers and then were genotyped using a second set of specific primers to identify HPV 16/18. Our results identified 15 positive cases (38.46%) to HPV 16 and 1 positive case (2.56%) for HPV 18. Hybridization *in situ* showed the presence of HPV DNA in 13 of 16 (81%) samples, in agreement with the PCR results. **Conclusions:** We demonstrate a higher prevalence of HPV 16 infection in lung adenocarcinomas than in lung squamous cell carcinomas. This result suggests that HPV infection may be associated with lung cancer. However, further studies are needed to elucidate the role of HPV in lung carcinogenesis.

Keywords: HPV, lung cancer, Mexico

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer pulmonar ocupa el segundo lugar en morbilidad por tumores malignos en ambos sexos, siendo la principal causa de muerte por cáncer en México, apreciándose el aumento en dicha tendencia (Franco *et al.*, 2001; Medina *et al.*, 2002). El tabaquismo sigue siendo el principal factor de riesgo sin embargo, es concebible que otros factores ambientales estén asociados en la carcinogénesis pulmonar tales como humo de leña, humos de combustibles, asbestos, arsénico, exposición a radón, entre otros (Hanahan and Weinberg, 2007; Sun *et al.*, 2007). Recientemente ha sido propuesta una etiología viral para cáncer pulmonar (Brouchet *et al.*, 2005; Syrjänen, 2002). Varias secuencias de genomas virales han sido detectadas en cáncer pulmonar incluyendo virus Epstein-Barr, algunos retro-virus zoonóticos como Jaagsiekte sheep en los criadores de ovejas que han desarrollado cáncer pulmonar y finalmente los papilomavirus humanos (VPHs) de alto riesgo en cáncer pulmonar (Roca *et al.*, 2008; Kasai *et al.*, 1994; Castillo *et al.*, 2006).

La infección por VPHs puede estar relacionada con la tumorigénesis pulmonar, la relación etiológica de los VPH's de alto riesgo en el desarrollo de cáncer pulmonar fue originalmente postulada por Syrjänen (Syrjänen, 2002) y confirmada en otros estudios cuyos hallazgos mostraron más frecuentemente los genotipos de VPH 16 y 18. La infección por VPHs está más frecuentemente asociada en pacientes no fumadores con cáncer pulmonar y con la variedad histológica de adenocarcinoma. (Cheng *et al.*, 2001; Fei *et al.*, 2006).

Los VPHs son virus epiteliotróficos y es posible que los tipos de alto riesgo (VPH 16/18) contribuyan al cáncer pulmonar como co-carcinógenos. Varios estudios que implican a los VPHs en carcinogénesis bronquial han encontrado un patrón histológico idéntico al observado en tumores de células escamosas clasificados como lesiones asociadas a los VPHs, ejemplo los tumores de la cavidad oral, esófago, laringe y conjuntivas (zur Hausen, 2009).

Estudios de prevalencia de infección por VPHs en cáncer pulmonar han reportado incidencia de 69% en Finlandia, 78% en Noruega, 55% en Taiwán, 22% en Italia, sin embargo estudios realizados en Grecia y EUA no han demostrado ninguna incidencia (Gorgoulis *et al.*, 1999; Fei *et al.*, 2006; Koshiol *et al.*, 2011). En América Latina la presencia de genomas de VPHs en cáncer pulmonar han sido reportados en un 29% en Chile, 8% en Perú y 33% en México estudiándose en este último solamente 15 casos (Castillo *et al.*, 2005).

Por los motivos expuestos nosotros investigamos la presencia de secuencias génicas de VPH's de alto riesgo 16/18 en tejidos de cáncer pulmonar de una población mexicana.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades del cáncer

La pérdida del control de la proliferación celular es una característica de las células tumorales y es el resultado de daños en los genes que regulan directamente el ciclo celular, es decir los proto-oncogenes, los cuáles son genes normales que han mutado a sus alter ego, codificando formas aberrantes de proteínas de señalización celular y/o proteínas supresoras de tumor (Jiménez *et al.*, 1999); se define al cáncer broncogénico como toda neoplasia surgida de células del epitelio respiratorio (Sun *et al.*, 2007).

Sinérgicamente ambas situaciones condicionan que el desarrollo tumoral suceda formalmente como un proceso análogo a la evolución darwiniana en la cuál una sucesión de cambios genéticos confiere ventajas reproductivas que tienden a la conversión progresiva de células normales a cancerosas, definiéndose así el cáncer como una proliferación desordenada de células anormales con capacidades adquiridas de novo las cuáles comprenden (Hanahan and Weinberg, 2000):

- 1.- Autosuficiencia en señales de crecimiento.
- 2.- Insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento.
- 3.- Evasión de la apoptosis.
- 3.- Potencial reproductivo ilimitado.
- 4.- Capacidad de angiogénesis sostenida.
- 5.- Invasión tisular y capacidad de metastatizar.

Históricamente la descripción más antigua del cáncer consta en el papiro de Edwin Smith y en el de George Ebers y se cree que son referencias que datan del 2500 a.c. y que se refieren a neoplasias malignas de mama, estómago y útero, en los cuales los primeros tratamientos consistían en pomadas, enemas de aceite de castor, cataplasmas y cirugías no especificadas.

Posteriormente la teoría griega de la enfermedad consideraba que ésta, era el resultado de un desequilibrio entre los fluidos ó humores corporales que gobiernan la salud del hombre: sangre, flema, bilis amarilla y bilis negra, y que el cáncer se debía a un exceso de bilis negra.

El manejo quirúrgico con bases técnicas surge hasta 1600 d.c. con los cirujanos Fabricius Hildanus, Johann Scultetus y Marco Severinus quienes realizaban mastectomías radicales. Sin embargo, la oncología nació como disciplina médica hasta el siglo XVIII con los trabajos de Jean Astruc y Bernard Peyrilhe quienes realizaban experimentos para confirmar o descartar hipótesis relacionadas con el cáncer.

El siglo XIX fue testigo de la descripción de anormalidades celulares en el cáncer descritas por Johannes Muller en 1838, así como del descubrimiento de los rayos X por Röntgen en 1895 y el radium por Marie y Pierre Curie en 1898, usando este medio físico en la batalla contra el cáncer en los albores del siglo XX pero con resultados inconclusos (Austin *et al.*, 1998).

Ya en el siglo XX, Teodoro Boveri propone una explicación genética para el cáncer mientras que la teoría de Percival Pott acerca de que el cáncer puede ser causado por sustancias químicas es confirmada a través de su conocido trabajo de los cánceres en los deshollinadores de chimeneas.

Es hasta 1950 en que Ernst Wynder y Evarts Graham reportan la asociación de cáncer pulmonar con el hábito de fumar. En 1969 Robert Huebner y George Todaro proponen la teoría oncogénica del cáncer, descubriéndose posteriormente en 1970, el primer oncogén el Src de los pollos por Hidesaburo Hana fusa y Peter Deber, lo que actualmente permite considerar que no importa la causa del cáncer, genética, viral, química ó multicausal, los mecanismos de inmortalización celular son los mismos. Harold Varmus, Michael Bishop y Dominique Stehelin encontraron en células humanas un gen parecido al Src nombrándolo como proto-oncogén y sugiriendo que están presentes en células normales de la mayoría de los animales.

En 1986 Thaddeus Dryja, Stephen Friend y Robert Weinberg, aíslan y clonan el gen perdido del retinoblastoma el *rb*, siendo el primer gen supresor de tumores conocido en seres humanos (Austin *et al.*, 1998).

2.2. Virus y cáncer

Los primeros virus oncogénicos fueron descubiertos por Ellerman y Bang en 1908 ya que mediante filtrados libres de células podían transmitir la leucemia de los pollos.

En 1911 Francis Peyton Rous presenta la primera teoría viral del cáncer modificada por Howard Temin con su hipótesis del provirus de DNA, Rous inyecta a pollos sanos con un filtrado libre de células y bacterias proveniente de pollos cancerosos, observando que los pollos sanos desarrollaron tumores cancerosos concluyendo que los virus fueron los causantes. Tal cáncer fue llamado sarcoma de Rous, logrando el premio Nobel hasta 1966 por tal descubrimiento (Rous, 1911; Javier and Butel, 2008).

En 1980 Robert Gallo demuestra que los virus RNA pueden causar cáncer en el humano probando que la leucemia de células T es causada por el virus HTLV -1 (Virus Linfotrópico de Células T Humanas-1) mientras que la leucemia de células “peludas” se relaciona con el virus HTLV-2 (Virus Linfotrópico de Células T Humanas-2).

Sobre la familia viral que nos ocupa, los papilomavirus, es hasta 1983 que Harald zur Hausen aísla el VPH tipo 16 en el cáncer cervicouterino investigación por la que se le otorga el premio Nobel en 2008 (Austin *et al.*, 1998).

La búsqueda de secuencias génicas de virus que pudieran estar relacionadas con cáncer en general ha sido extensa. Sugiriéndose que el 15-20% de todas las lesiones cancerosas podrían estar relacionadas a VPH oncogénicos, tal es el caso del cáncer cervicouterino (Ca Cu) en el que se ha implicado a los VPH de alto riesgo tipo 16 y 18. El linfoma de Burkitt causado por el virus Epstein-Barr, el sarcoma de Kaposi asociado al virus herpes 8, el cáncer hepático asociado a los virus de la hepatitis B y C, el virus del tumor

mamario murino (MMTV), como probables co-carcinógenos entre otros (zur Hausen, 2009; Syrjanen, 2002; Giuliani *et al.*, 2007).

2.3. Cáncer de pulmón

Estrictamente se define como toda neoplasia maligna que se origina a partir del epitelio respiratorio bronquial o alveolar y se denominará como cáncer broncogénico (National Cancer Institute, 2008).

Existen dos categorías histológicas de cáncer pulmonar primario clínicamente importantes considerando el origen y comportamiento de las células cancerosas:

1.- El cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) que es el de la más alta prevalencia, con aproximadamente el 75% de los tipos de cáncer broncogénico, resistente a quimio y radioterapia el cuál se subdivide en tres tipos:

A.- Carcinoma de células escamosas ó Epidermoide.

B.- Adenocarcinoma, que actualmente a pasado a ocupar el primer lugar en frecuencia y,

C.- Carcinoma de células grandes.

2.- Cáncer pulmonar de células pequeñas (SCLC), también llamado carcinoma de células en avena. Primariamente sensible a quimio y radioterapia pero que las recaídas se tornan resistentes a estos tratamientos siendo extraordinariamente agresivo por su tendencia temprana a la diseminación (Rivera and Salazar, 2002; Berlingd y Lenfant, 1982; National Cancer Institute, 2002).

Una vez diagnosticado deberá estadificarse de acuerdo a la clasificación TNM, la cuál fue propuesta por Denoix en 1946, y descrita en detalle por Mountain y sus colaboradores, que toma en cuenta la localización y el tamaño del tumor (T), la existencia o no de nódulos linfáticos regionales (N), y la presencia o no de metástasis extra torácicas (M), surgiendo así la estadificación que va desde el carcinoma oculto Tx,

que es la presencia de células neoplásicas sin conocer su ubicación anatómica, hasta el estadio IV (Fraser and Paré, 1979).

2.4. Epidemiología

La frecuencia del cáncer pulmonar en México ha aumentado en épocas recientes sin que las causas de ello estén completamente dilucidadas, observándose además, un tipo histológico predominante que en la actualidad es el adenocarcinoma.

Las causas que explicarían la tendencia creciente del cáncer pulmonar podrían englobarse en dos grupos:

En el primero estarían aquellas causas no asociadas con un incremento real en el riesgo de desarrollar la enfermedad, como serían su mejor diagnóstico y el crecimiento acelerado y envejecimiento de la población.

En cuanto al segundo grupo se encontrarían las causas asociadas a un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer pulmonar como serían una mayor prevalencia o intensidad del tabaquismo o a una mayor exposición a otros factores de riesgo en la población como pudiesen ser la contaminación ambiental, radiaciones o pudiesen ser la exposición a ciertos agentes virales entre ellos a los virus del papiloma humano (VPHs) de alto riesgo, motivo del presente trabajo (Franco *et al.*, 2001).

La descripción de la epidemia de cáncer pulmonar en México para diferentes regiones del país, según su desarrollo socioeconómico, muestra una difusión de la epidemia de las regiones más desarrolladas a las menos desarrolladas, con una importante reducción en la morbi-mortalidad para las primeras y un incremento para las segundas, al menos para las primeras décadas del presente siglo.

Para las regiones más desarrolladas los casos de cáncer pulmonar aumentarán principalmente por el envejecimiento de la población, mientras que para las regiones

menos desarrolladas, como la nuestra, aumentarán además por una incidencia creciente de la enfermedad asociada a una mayor exposición a las causas desencadenantes de la neoplasia como por ejemplo persistencia del tabaquismo, -aunque es bien conocido que no todos los fumadores desarrollaran cáncer broncogénico y que estos tumores ocurren en pacientes que nunca fumaron- (Sun, 2007) y otros factores co-carcinógenos ya comentados, entre ellos posiblemente el VPH, (Moore, 2001), ya que es de extremo interés las observaciones recientes que reportan un incremento del riesgo de cáncer pulmonar entre los tabajeros, donde la infección por VPH es altamente prevalente. Claramente todas estas observaciones epidemiológicas concuerdan con la idea de que el VPH pudiera estar involucrado en la carcinogénesis bronquial (Syrjänen, 1979).

Con relación a la diferencial en la mortalidad por NSCLC por género, se ha mantenido más o menos constante durante las últimas décadas, esta neoplasia maligna ocupa el primer lugar de mortalidad por cáncer en nuestro país, teniendo como factores de riesgo de primera importancia la exposición a humo de tabaco, contaminación ambiental como la exposición a humo de biomasa, relación importantísima en nuestro medio rural, donde se emplea leña y otros combustibles en la preparación de los alimentos, radiaciones y asbestos así como la existencia de lesiones pulmonares fibrosas previas, susceptibilidad genética y, entre otros se encuentran probablemente los agentes biológicos como los virus (Franco *et al.*, 2001).

2.5. Oncovirus y cáncer pulmonar

Existen numerosos trabajos de investigación que correlacionan esta neoplasia y una etiología viral. Ejemplo de ello son los virus del papiloma humano (VPHs) de alto riesgo relacionados con el cáncer pulmonar principalmente en mujeres ya que se ha especulado que el VPH aborda el pulmón vía hemática, proveniente de sitios distantes infectados tales como el tracto genital, como lo demuestra el DNA de VPH detectado en linfocitos de sangre periférica de mujeres con infección cervical por este virus (Syrjänen, 2002). Sin dejar de considerar la vía aérea como probable vía de transmisión considerada por nosotros como una hipótesis, durante las prácticas de sexo oral.

El virus del simio 40 (SV40) se ha correlacionado con el desarrollo de mesotelioma (Massion and Carbone, 2003) mientras que el virus de Epstein-Barr (EBV) con los linfomas de pulmón, también se ha relacionado esta neoplasia con el citomegalovirus, y entre otros se menciona al retrovirus Jaagsiekte Sheep (JSRV) presente en las ovejas, y al virus del tumor mamario murino (MMTV) (Barsky, 1999; Zapata *et al.*, 2007).

Sin embargo, en otros reportes no se ha demostrado la presencia de VPH's u otros tipos virales en amplias y diferentes poblaciones de pacientes con cáncer pulmonar (Gorgoulis, *et al.*, 1999; Fei, *et al.*, 2006; Koshiol *et al.*, 2011).

2.6. Detección de DNA de VPHs

El rango de detección del DNA de VPH en carcinomas bronquiales usando diversas técnicas de hibridación, dot-blot, hibridación *in situ* (ISH), Southern blot, ó análisis mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR), tiene una amplia variación desde 0 % al 100%, encontrándose en el total de los casos estudiados un 21.7% de positividad, donde sin duda el tipo predominante es el VPH 16, responsable del 49.8 % de los casos positivos. El segundo tipo en frecuencia es el VPH 18, encontrado en el 21.8% de los casos positivos a VPHs. Otros VPHs de alto riesgo detectados en carcinomas bronquiales incluyen los tipos 31, 33, y 35 siendo los mismos tipos de alto riesgo implicados en la etiología de los carcinomas de células escamosas del área ano-genital, cabeza y cuello (Yousem, 1992).

En México, solo encontramos un estudio que reporta la presencia de VPH, en 5 de 15 pacientes (33%) con cáncer pulmonar con prevalencia del tipo VPH 16 mientras que en América Latina los estudios de prevalencia realizados en Chile reportan un 29%, en Colombia y Perú 28%, mientras en otras poblaciones como Finlandia y Noruega la prevalencia es de 69 y 78 % respectivamente, en Taiwan 55%, Italia 22% India 5% pero los estudios realizados en Grecia y otras latitudes reportan 0% (Gorgoulis *et al.*, 1999; Fei *et al.*, 2006; Koshiol *et al.*, 2011).

2.7. Taxonomía de los papilomavirus

Cientos de tipos de papilomavirus han sido detectados en humanos, de los cuales solo 118 tipos han sido descritos completamente.

La clasificación de este grupo diverso de virus el cual incluye importantes patógenos para el humano ha sido debatida durante décadas.

Los papilomavirus pertenecen a la familia de los papillomaviridae agrupados en niveles jerárquicos taxonómicos de género, especie, tipo, subtipo, y variantes basándose en la comparación de secuencias génicas de la región L1 que es la más conservada del genoma de estos virus, según los criterios generales establecidos por el Comité Internacional para la Taxonomía de virus (ICTV).

Diferentes géneros poseen menos del 60% de identidad en las secuencias nucleotídicas en el ORF (*Open Reading Frame*) de L1 ó bien, si se compara la secuencia total del genoma poseen más del 23 % pero menos del 43% de identidad; para las especies dentro de un genero, poseen del 60 al 70% de identidad nucleotídica, mientras que tipos tradicionales de papilomavirus (PVs) dentro de una especie poseen del 71 al 89% de identidad nucleotídica en el ORF de L1.

Los criterios para clasificar subtipos es que posean una divergencia genómica del 2-10% del tipo con el que se compare. Finalmente las variantes de PVs de los diferentes tipos muestran del 1- 2% de diversidad en su secuencia (Figura 1) (de Villiers, 2004; zur Hausen, 2009).

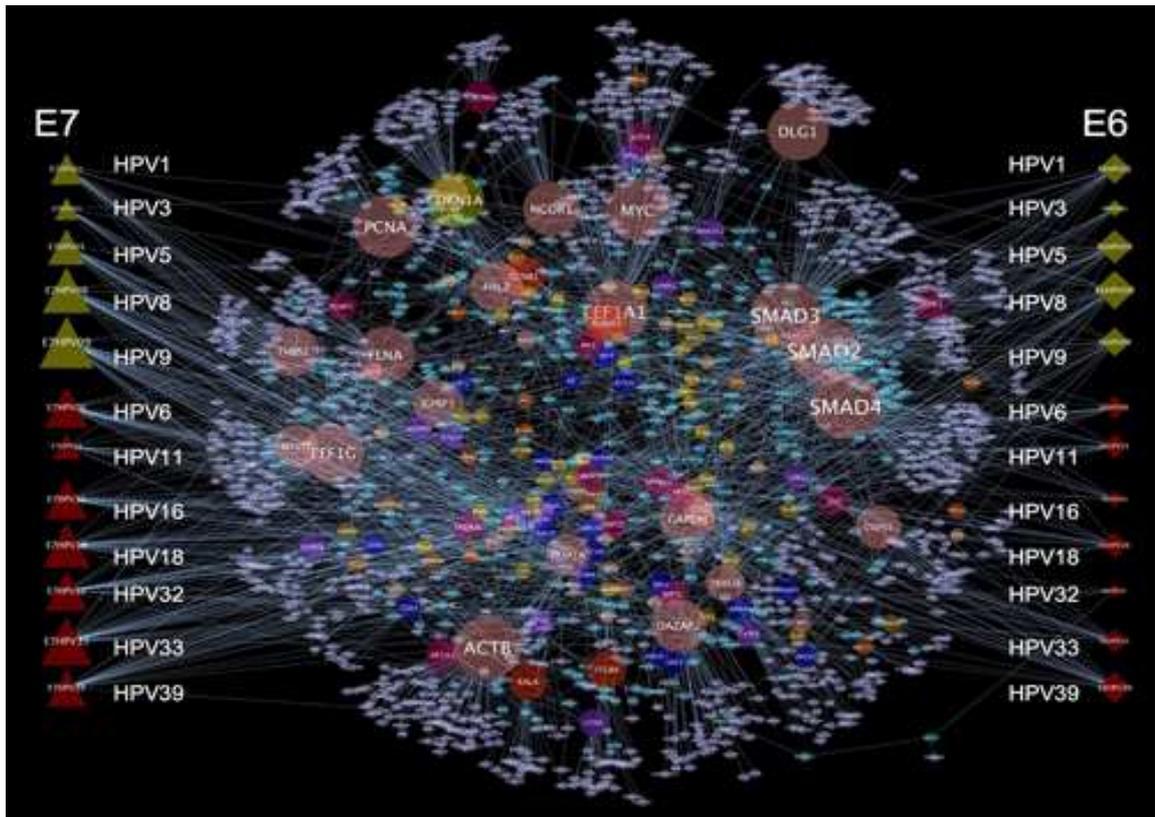


Figura 1. Taxonomía de los papilomavirus (PVs)

Los VPHs poseen un genoma de DNA circular, doble cadena, que contiene entre 6800 – 8000 pb (8kb) dividido en 8 ORF; E6, E7, E1, E2, E4, E5 y L2, L1, de los cuales 3 son oncogenes E5, E6, E7, que modulan el proceso de transformación oncogénica, 2 son genes reguladores E1, y E2 que modulan la transcripción y replicación, mientras que otros 2 son genes estructurales L1, y L2 que codifican para las proteínas que integran la cápside viral (Figura 2).

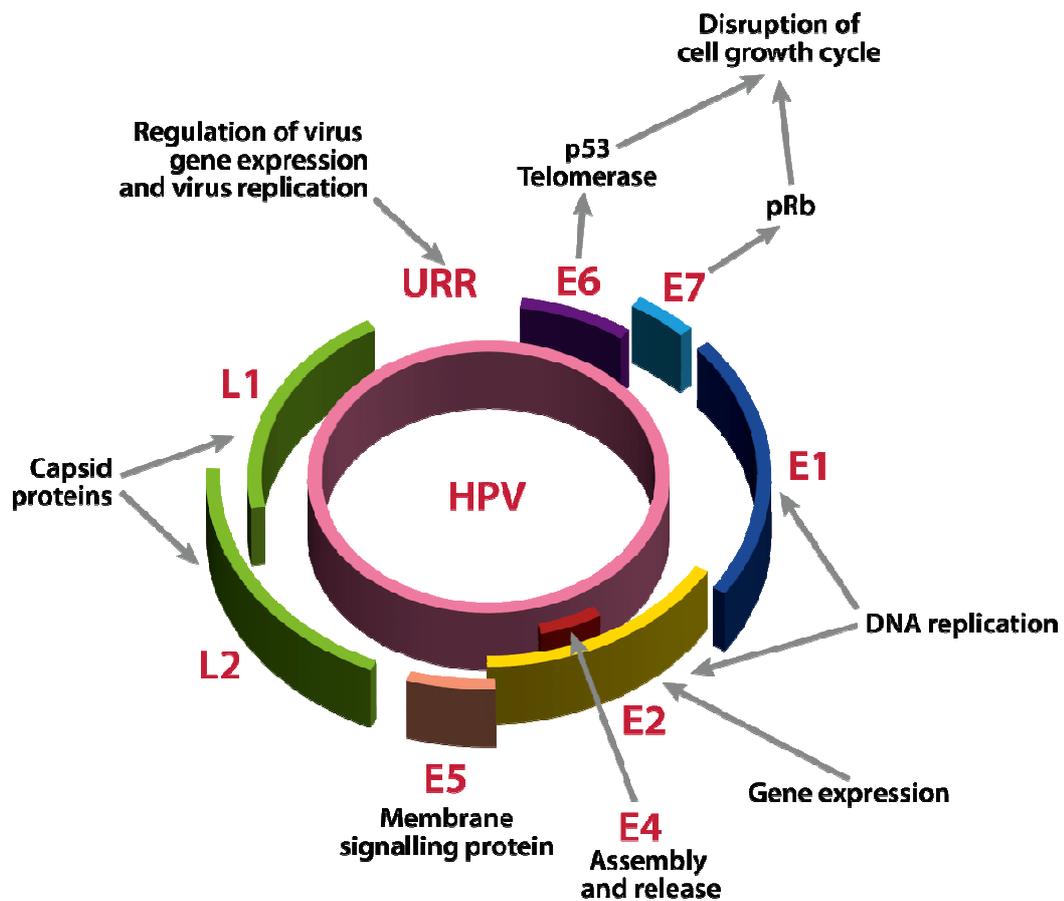


Figura 2. La organización circular del genoma de los VPHs. Tomado de zur Hausen, 2012.

Los papilomavirus humanos (VPHs) tipo 16 y 18, motivos de este reporte, son clasificados como virus de alto riesgo para el desarrollo de neoplasias y se clasifican: el VPH 16 dentro del género alfa- papilomavirus, especie No. 9, mientras que el VPH 18 pertenece al mismo género, especie No 7 (de Villiers, 2004).

2.8. Patogenia

La existencia de uniones escamoso-columnares en el epitelio respiratorio es un requisito para la diseminación de las infecciones por VPH en esta región ya que es el sitio de entrada del virus sobre todo en las células de metaplasia escamosa en los epitelios bronquiales, donde la causa mas importante de que se formen estas uniones escamoso-

columnares es el humo del tabaco el cual frecuentemente desarrolla las áreas de metaplasia (Figura 3).



Figura 3. Áreas de metaplasia escamosa del epitelio respiratorio. Se señalan células metaplásicas que han perdido sus cilios y las uniones escamoso-columnares.

Hasta ahora, no se ha podido identificar el receptor que permite la entrada del VPH a las células epiteliales, proponiéndose a la integrina alfa-6 beta-4 proteína de superficie que se expresa durante los procesos de reparación del los epitelios, observándose también que los viriones de VPH se unen a la heparina de la superficie celular como anclaje inicial, endocitándose posteriormente (Figura 4).

El virus es conducido vía los microtúbulos, por las proteínas motoras dineínas siendo introducido al núcleo a través del complejo del poro nuclear usando como transportadores las importinas 11 y 45 (Figura 5) (de la Cruz HE., 2004).

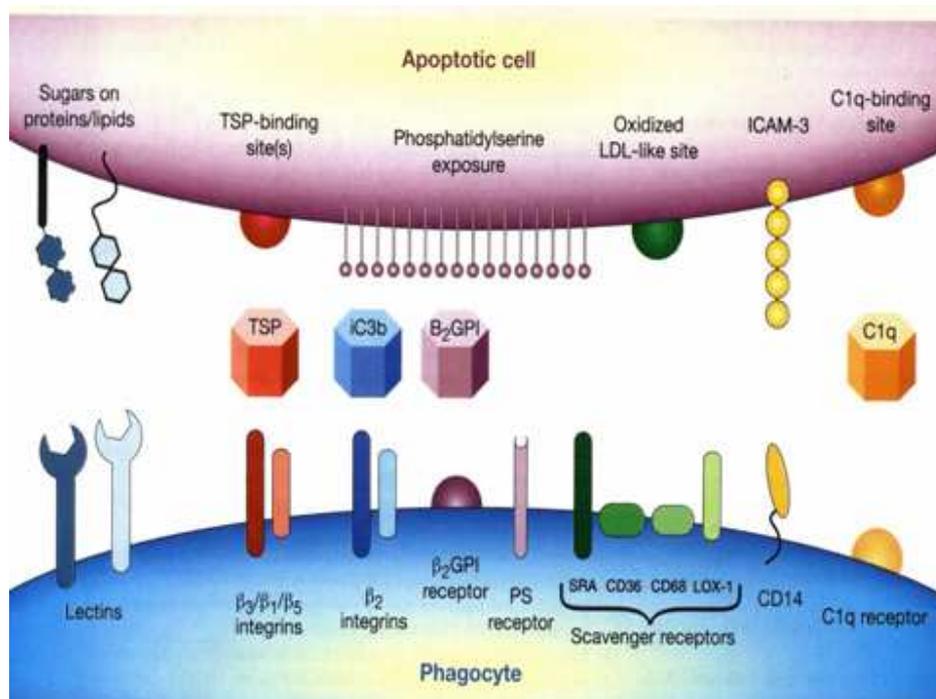


Figura 4. Receptores y moléculas señalizadoras de membrana. Se ejemplifican las integrinas y heparinas de superficie.

Así, la situación en el bronquio con múltiples focos de metaplasia escamosa es un reminisciente de esos que están presentes en la zona de transición del cérvix uterino el cual es el sitio de entrada conocido del VPH y también el asentamiento de lesiones condilomatosas y lesiones precursoras de cáncer cervical, (IARC, 1995) lesiones benignas, premalignas y malignas que también ocurren en el bronquio, apreciándose como evidencias morfológicas los cambios citopatológicos característicos que ocasiona el VPH, esto es presencia de koilocitos encontrados en muestras de expectoración derivadas de lesiones bronquiales benignas, como el papiloma de células escamosas, enfatizando su similitud morfológica con los condilomas genitales y con papilomas benignos de otras mucosas donde se ha encontrado mediante hibridación *in situ* (ISH) DNA de VPH tipo 6/11, mientras que los tipos oncogénicos son detectados en lesiones malignas, la similitud morfológica descrita es apreciada alrededor de las lesiones del carcinoma de células escamosas bronquiales (Syrjänen, 1979).

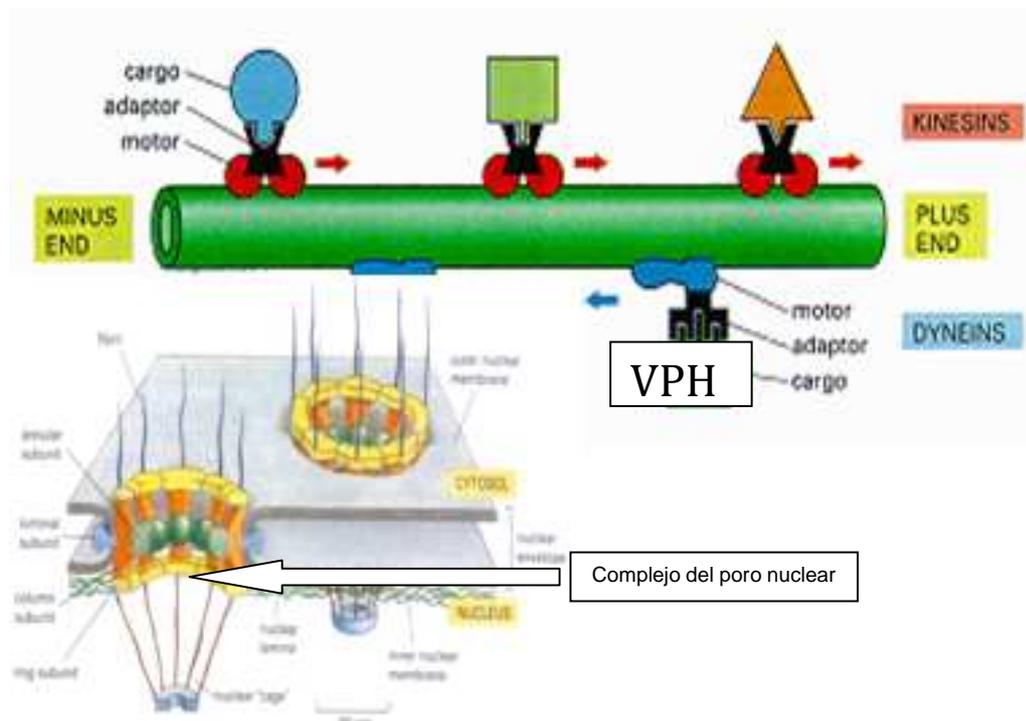


Figura 5. Vías citoplásmicas a través de patrones de tráfico y vía endocítica utilizada por el VPH.

El ciclo replicativo de estos virus difiere de todas las otras familias de virus, ya que la infección requiere de la viabilidad de las células de la capa basal que sean capaces de proliferar, ya que el virus necesita la maquinaria replicativa celular para la síntesis del DNA vírico, en esas células la expresión génica viral es largamente suspendida, el genoma vírico permanece como un elemento extracromosomal en forma de episoma, el virus replica su DNA para mantener un número de 50 – 100 copias del genoma dentro de las células basales y parabasales las cuales no son lisadas y así la infección permanece durante largos periodos de tiempo luego, al dividirse estas células infectadas una célula hija permanece en la parte basal del epitelio, y la otra inicia un proceso de diferenciación en la parte superior del epitelio constituyendo esto, la etapa la etapa no productiva del ciclo de replicación del VPH.

En la etapa productiva, el genoma vírico se amplifica aumentando el numero de copias presentes en la célula y se expresan posteriormente los genes tardíos que codifican las proteínas de la cápside, activándose solamente en células parcialmente diferenciadas ya que esto solo puede observarse en los estratos superiores del epitelio donde las partículas

virales son ensambladas y liberadas, no así en las capas basales (Figura 6) (de la Cruz, 2004).

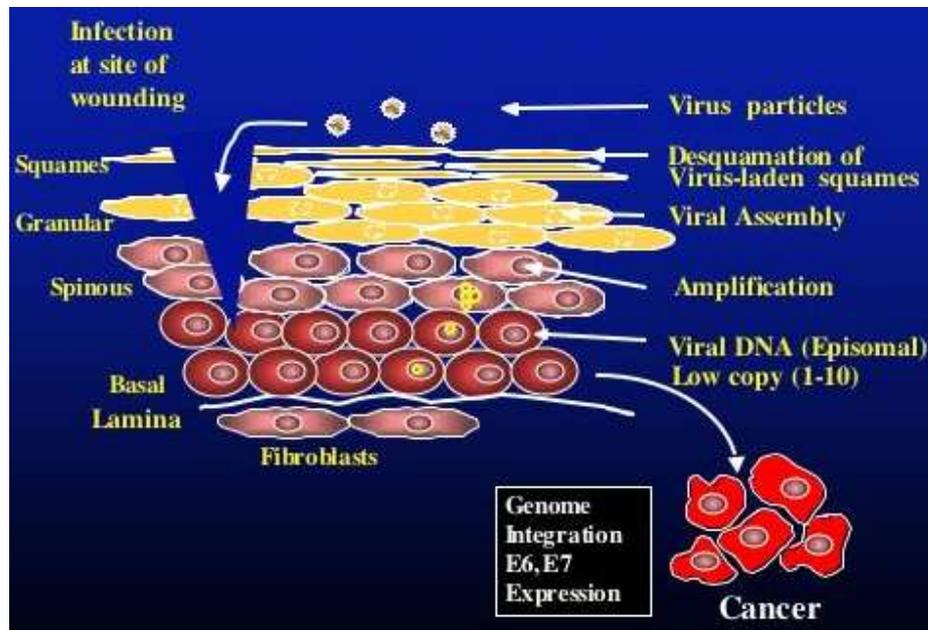


Figura 6. Ciclo replicativo del papilomavirus humano.

El mantenimiento del genoma vírico en las células infectadas es esencial para el ciclo de vida del virus, la replicación del DNA vírico se inicia con la unión de E1 y E2 a secuencias específicas de DNA dentro de la región larga de control (LCR).

La proteína E1 funciona como un iniciador de la replicación uniéndose al origen de replicación vírica que consiste en secuencias ricas en A/T flanqueadas por dos o tres sitios de unión a E2 e interactuando con diversas proteínas celulares de la replicación.

El gen E2 codifica tres proteínas diferentes generadas por procesamiento alternativo, una proteína completa E2, la cual regula la replicación del DNA vírico y la transcripción del RNA vírico funcionando como elemento transactivador, E2 puede reprimir la transcripción de promotores que controlan la expresión de los genes transformantes E6 y E7, principalmente durante la etapa inicial de la infección. Las otras dos proteínas de E2 son E1/E2C y E2C que pueden inhibir la acción de E2 al unirse competitivamente a su sitio de unión o formando complejos con E2.

La proteína E2 reconoce la secuencia palindrómica ACCN₆GGT la cual se encuentra en múltiples copias dentro de la LCR vírica funcionando como activador de la transcripción, esta proteína tiene dos dominios funcionales, el dominio N-terminal que consiste en aproximadamente 200 aminoácidos y su función es importante en la transcripción, mientras que el dominio C-terminal de aproximadamente 100 aminoácidos interviene en la unión al DNA y su dimerización (de la Cruz, 2004).

En el curso del desarrollo del cáncer, el DNA viral llega a ser integrado en el DNA de la célula huésped a través de la intervención de las integrasas así, la molécula circular es abierta en el ORF de E2 irrumpiendo la continuidad de ese gen, parte de E2 y de los ORFs adyacentes E4, E5, y parte de L2 son regularmente perdidos después de la integración.

De los 3 oncogenes que poseen actividad estimulante proliferativa, E5 parece ser importante en el curso temprano de la infección ya que estimula la proliferación celular formando un complejo con los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), con el factor β de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF β R) y con el factor 1 estimulante de colonias, aunque posteriormente al integrarse el DNA viral al DNA de la célula huésped, E5 es eliminado por lo que no participa en los eventos tardíos de la carcinogénesis (zur Hausen, 2002).

En tejidos neoplásicos los genes E6 y E7 y sus respectivas proteínas están consistentemente expresadas y juegan un papel significativo en esa transformación neoplásica y son capaces de immortalizar células en diferentes tipos de cultivos, aunque su eficiencia se incrementa cuando actúan en forma sinérgica ya que inactivan p53 y pRb, proteínas supresoras de tumor, respectivamente, entre otros mecanismos tumorigénicos. La síntesis de las oncoproteínas E6 y E7 es condición *sine qua non* para la transformación oncogénica celular y desarrollo del cáncer, y se efectúa a través de un proceso de transcripción-traducción del genoma del VPH bastante complejo.

Un promotor común, p97, en VPH 16 controla la transcripción de E6 y E7 usando un mecanismo de procesamiento alternativo. Un transcripto E6/E7 codifica la oncoproteína E6 derivada del mRNA bicistrónico, mientras que E7 es codificado por productos del procesamiento de E6*I y E6*II. Recientemente un promotor nuevo (p670) en el ORF de E7 fue identificado en líneas celulares transformadas por VPH 16 (Giuliani, 2007).

Varias funciones se han atribuido a estas oncoproteínas E6 y E7 codificadas solo por VPHs de alto riesgo.

2.9. Oncoproteína E6

Es una fosfoproteína, formada por aproximadamente 150 aminoácidos con dos dominios de “dedos de zinc”. Es fosforilada por la proteína cinasa A (PKA) en los residuos de treonina del extremo carboxilo terminal y sus funciones transformantes están mediadas por su interacción con una gran variedad de proteínas celulares.

El blanco celular más conocido de E6 es la proteína supresora de tumores p53, para la que E6 promueve su degradación a través del sistema degradativo de la ubiquitina-proteasoma (WernessBA, 1990). En condiciones normales, la degradación de p53 es mediada a través de la ligasa Mdm2, sin embargo, ante un daño al DNA, p53 se estabiliza mediante su fosforilación por la cinasa Chk2, evitando la interacción con Mdm2 y su degradación. La proteína p53 es un factor de transcripción que, en forma directa o induciendo la expresión de genes, asegura de diferentes maneras la integridad del genoma, ya que inhibe a la cinasa CAK y previene la activación de Cdk2, (Schneider, 1998) induce la transcripción de la CDKIp21^{cip1} la cual inhibe la progresión del ciclo en la fase G1, induce proteínas que inhiben la síntesis de DNA, como GADD45 (proteína de arresto por daño al DNA), induce la reparación del daño al DNA y activa la transcripción de proteínas proapoptóticas como BAX, que participan en la apoptosis celular cuando el daño es irreparable (Miyashita, 1995; Badillo, 2003; Weinberg, 1996). Las proteínas resultantes de tales mutaciones pierden la capacidad de interrelacionar con el DNA y de verificar la integridad del genoma, así las células deficientes en p53 no

reparan los daños producidos por los agentes genotóxicos produciendo inestabilidad genómica. (Weinert, 1993) Se refiere que la frecuencia de mutaciones en el gen p53 en NSCLC es de 50%, mientras que en los SCLC es del 80% (Carbone, 1996).

En las células que expresan E6 la degradación de p53 se realiza al formar un complejo con E6 unida a una proteína llamada E6-AP, como resultado p53 no se activa en forma adecuada lo que permite la supervivencia de la célula y acumulación de mutaciones, además, se ha observado que E6 puede retener a p53 en el citoplasma evitando su importación al núcleo inhibiendo su función independientemente de su degradación (Mantovani, 1999).

De las otras interacciones de p53 con dianas celulares menos conocidas podemos enumerar otras que contribuirían a mantener el fenotipo maligno y dependiendo del tipo de interacción con factores celulares pueden dividirse en:

- 1.- Regulación de la transcripción y replicación del DNA.
- 2.- Regulación de la apoptosis.
- 3.- Regulación de la organización y diferenciación celular.
- 4.- Polaridad celular e interacción célula-célula.

Efectos sobre la transcripción y replicación del DNA.

La oncoproteína E6 interactúa con un co-activador de la transcripción denominado p300/CBP el cuál activa la transcripción de un gran número de genes involucrados en la regulación del ciclo celular, diferenciación y respuesta inmune de este modo inhibe la transcripción de genes involucrados en la producción de citocinas como IL-8, además de inhibir la acción del factor de transcripción NF- κ B. P300/CBP puede actuar como acetilasa de histonas (HAC) activando así la transcripción mediante la remodelación de la estructura nucleosomal en una conformación abierta lo que permite el acceso de diversos factores de la transcripción a diversos genes, entre ellos los de citocinas inflamatorias.

Así, E6 puede activar de forma indirecta la transcripción de ciertos genes, observándose además que puede modular la transcripción de promotores que contengan elementos TATA en su secuencia, con el agravante que E6 puede funcionar como un factor de transcripción celular por la homología estructural que presenta con estos, pues posee dominios “dedos de zinc” que se unen a sitios del DNA para activar la transcripción celular (Mantovani, 2001).

En adición, la activación de la telomerasa y la inhibición de la degradación de la familia de las cinasas SRC parece contribuir al fenotipo transformado por VPH (zur Hausen, 2002).

Inhibición de la apoptosis.

Es importante que el virus evite la muerte celular hasta que se haya replicado. Las proteínas E6 de alto riesgo inhiben la apoptosis mediada por p53 al inducir su degradación, sin embargo E6 también puede inhibir las vías de apoptosis independiente de p53 sin importar el estímulo que desencadene su activación. Entre otros blancos celulares de E6 se encuentra Bak una proteína proapoptótica expresada en epitelios diferenciados, así como con otras proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 como BAX y BID, la cual E6 promueve su degradación por la vía de la ubiquitinación. De igual forma que en la degradación de p53, E6 forma un complejo con E6-AP y Bak para promover su degradación (Barbosa, 1996; zur Hausen, 2002; Badillo, 2003).

La vía mitocondrial es una ruta fundamental en la apoptosis, la cual es activada por estímulos internos, como la activación de p53 que recluta esas proteínas proapoptóticas en la membrana mitocondrial, tal como BAX, la cual tiene función de porina y ocasiona hinchazón seguida de liberación del citocromo c el cual en unión con el Apaf-1 integra el apoptosoma que cataliza a la procaspasa 9 a caspasa 9 activa ejecutora de la apoptosis. La familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) esta involucrada en la regulación de la célula cancerosa, tales receptores traducen señales de muerte celular cuando se unen a sus respectivos ligandos, el receptor más importante de ellos es la

proteína homotrimérica transmembranal Fas (CD95) el cual activa FADD (Fas associated death domain) en su dominio citoplásmico, así FADD induce una sucesión de eventos tendientes a la activación de la apoptosis vía activación de la caspasa 3 (Badillo, 2003).

La proteína c-Myc es un factor de transcripción que forma dímeros con la proteína Max, el dímero Myc-Max induce la transcripción de varios genes cuyos productos son necesarios para la proliferación celular y es degradado normalmente por la vía del proteasoma, (Jiménez, 1999) sin embargo las proteínas E6 de alto riesgo pueden acelerar su degradación al formar un complejo con E6-AP, siendo algo inusual ya que una de las funciones de c-Myc consiste en estimular la proliferación celular, por lo cual puede interpretarse que la finalidad de la degradación de c-Myc va dirigida a su actividad proapoptótica (de la Cruz, 2004).

Regulación de la organización y diferenciación epitelial.

Los VPHs de alto riesgo se replican en las placas diferenciadas del epitelio escamoso, en un medio ambiente que no permite la replicación del DNA, las proteínas E6 de alto riesgo tienen capacidad para inhibir el proceso de diferenciación terminal de las células epiteliales, lo cual las conduciría normalmente a su queratinización y muerte. El hecho de que E6 de VPH 16 incremente la resistencia de los queratinocitos humanos a la diferenciación inducida por calcio y suero a través de las vías independientes de p53, indica que se desconoce el mecanismo molecular, sin embargo E6 interactúa con E6BP/ERC55, una proteína relacionada con la unión al calcio localizada en el retículo-endoplásmico, observándose *in vivo* que E6BP forma un complejo con E6 y E6-AP que probablemente conduzca a su degradación.

Finalmente, entre otros blancos celulares de E6 esta la paxilina, proteína de adhesión focal involucrada en la traducción de señales y remodelación del esqueleto de actina; se ha identificado una clase de proteínas que poseen dominios PDZ que se unen en forma directa al extremo C-terminal de E6 de alto riesgo, tales proteínas PDZ son: hD1g un

homólogo de la proteína supresora de tumores Dlg de *Drosophila*, MAGI-1 una proteína involucrada en la unión celular y la proteína hScrib involucrada en el control de las uniones celulares así como en la proliferación celular. Proteínas que se expresan en sitios de contacto célula-célula y están relacionadas con el control de la división y polaridad celular (Figura 7) (de la Cruz, 2004).

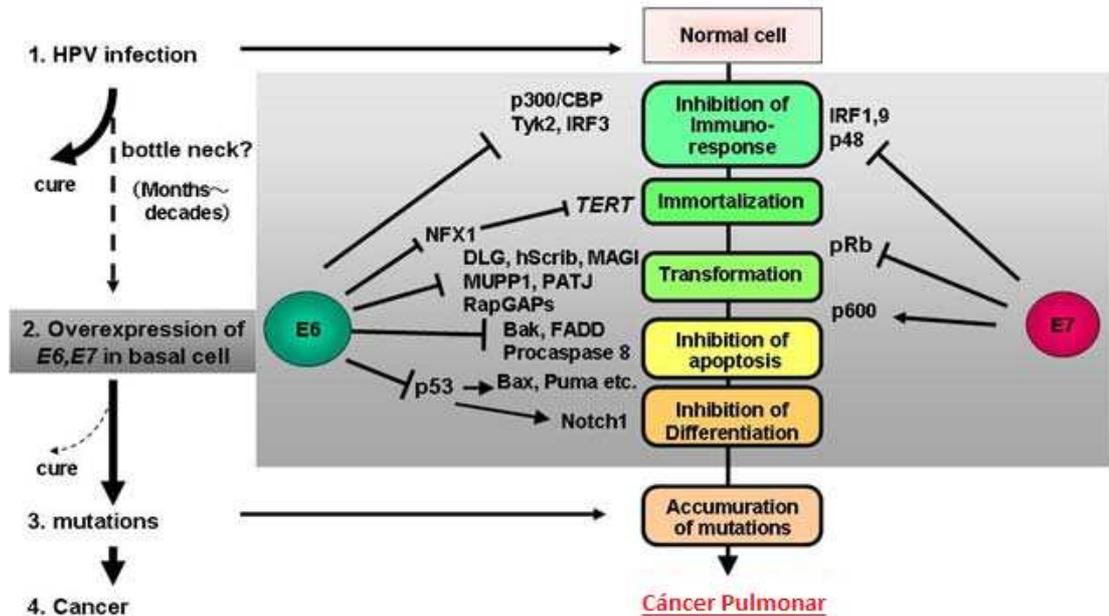


Figura 7. Funciones de las oncoproteínas E6/E7 y sus interacciones que tienden a la inmortalización celular.

2.10. Oncoproteína E7

E7 codifica una fosfoproteína de aproximadamente 100 aminoácidos, con un dominio de unión a zinc en la región C-terminal a través del cual se dimeriza o polimeriza, y un sitio de fosforilación en su región N-terminal, donde es fosforilada por la caseína quinasa II, su localización es predominantemente nuclear aunque se han detectado niveles muy bajos en el citoplasma y otros compartimientos celulares, lo cual se relaciona con la capacidad de E7 para interactuar principalmente con blancos celulares implicados en la síntesis de DNA y el control del ciclo celular. E7 interactúa con numerosos blancos celulares, tales como Rb, p107, p130, ciclina A, ciclina E, desacetilasa de histonas (HDAC) y Ap-1 (Guccione *et al.*, 2002; Antinore *et al.*, 1996).

Debido a la naturaleza de estas proteínas se puede determinar que el principal papel de E7 consiste en alterar el control del ciclo celular normal. Es decir la expresión de E7 esta asociada con un incremento en la síntesis de DNA, así como con un aumento en la proliferación celular, características que son el resultado de la interacción entre E7 y las proteínas de la familia Rb, estas interacciones interfieren con la habilidad de Rb para inhibir la activación del factor de transcripción E2F, de modo que E7 forma un complejo con Rb promoviendo su degradación a través del sistema de ubiquitinación, esto permite que el factor E2F active la transcripción de los genes involucrados en la síntesis de DNA, tales como la dehidrofolato reductasa, cdc 2, ciclina A, ciclina E, y polimerasa alfa (Adams, 1995). Además de la degradación de Rb, E7 sin embargo parece ser que bloquea la función de los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas WAF1 (conocido como CIP1 y p21) y KIP1 (conocido como p27) y sobre-regula la expresión de INK4A lo que pudiese considerarse como contradictorio (Adams *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1997; Zerfass-Thome *et al.*, 1996).

Pero analizando este efecto sinérgico y complementario de las oncoproteínas, vemos que la acción de E6 parece ser debilitada por INK4A, lo que se evita mediante la acción de E7 que activa la expresión de los genes de las ciclinas A y E, en reciprocidad E6 previene la apoptosis inducida por E7 degradando las proteínas inductoras de apoptosis p53 y BAK. Adicionalmente induciendo la amplificación de los centriolos, E7 induce aneuploidias, lo que contribuye a la tumorigénesis (Figura 8) (zur Hausen, 2002).

Debido a la integración del genoma del VPH durante la transformación maligna, el gen E5 no se expresa en los tumores cervicales, pero la proteína E5 esta localizada principalmente en el aparato de Golgi así como en endosomas y otras membranas intracelulares, siendo su principal función reducir el requerimiento de factores de crecimiento necesarios para la proliferación celular. Aunque su actividad transformante es débil, se ha observado que E5 de VPH 16 posee la capacidad de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) e incrementar su expresión en la superficie celular al inhibir su degradación. La inhibición en la degradación de los receptores podría ser el resultado de la interacción de E5 con la subunidad 16kDa de la ATPasa

vacuolar, evitando la acidificación de los endosomas necesarios para su degradación (Straight, 1995).

E5 puede activar otras proteínas involucradas en la proliferación celular, tales como la cinasa MAP y el receptor del factor de crecimiento β derivado de plaquetas (PDGF β R), aunque posteriormente al integrarse el DNA viral al DNA de la célula huésped, E5 es eliminado por lo que no participa en los eventos tardíos de la carcinogénesis (zur Hausen, 2002; Gu, 1995; DiMaio, 2000).

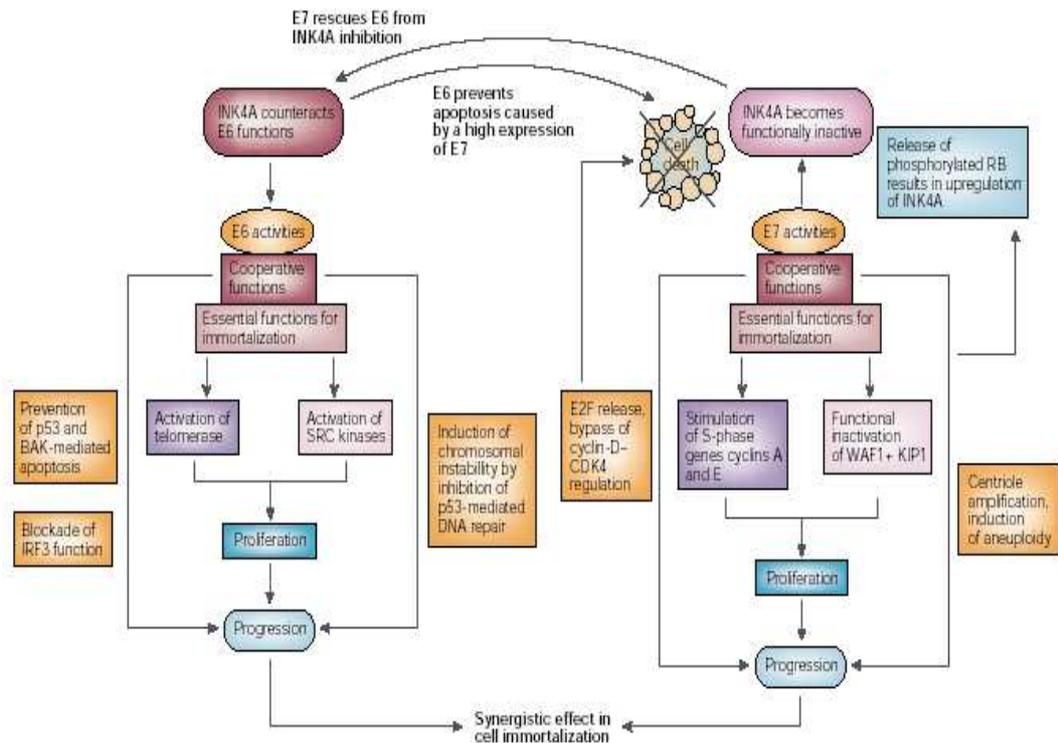


Figura 8. Funciones de las oncoproteínas E6/E7 y su sinergia que tiende a la immortalización celular.

2.11. Expresión de genes tardíos

Las funciones víricas tardías, tales como la síntesis del DNA vírico, síntesis de proteínas de la cápside, y ensamblaje de los viriones ocurre exclusivamente en las células diferenciadas. La transcripción de los genes víricos tardíos está regulada por un promotor específico localizado dentro del marco de lectura del gen E7, dicho promotor

depende del proceso de diferenciación celular y controla la expresión de las proteínas de la cápside, L1 y L2, así como de la proteína E4, generadas a partir de un RNAm policistrónico. La proteína E4 se expresa solamente en las células diferenciadas del epitelio, su marco de lectura está localizado dentro de la región temprana, sin embargo al encontrarse bajo la acción de un promotor específico de la diferenciación se expresa como un gen tardío. Se origina de un transcrito formado por un procesamiento entre el marco de lectura de E1 y E4, E1/E4.

La función principal de E4 consiste en inducir la ruptura de las redes de citoqueratina, permitiendo la liberación de los viriones sintetizados durante la fase productiva de la replicación vírica. Además de esta función, se ha observado que E4 detiene el ciclo celular en la fase G2/M, lo que permite la síntesis de DNA y división nuclear en ausencia de división celular (Pray, 1995; Nakahara *et al.*, 2002).

Se han propuesto varios modelos de como se activa la producción de viriones en las placas superiores del epitelio, uno de ellos propone que la activación de los genes víricos tardíos es el resultado de la interacción de los promotores tardíos con factores de transcripción celulares específicos de la diferenciación, tal como los factores de transcripción Ying Yang 1 (YY1), Skn-1 y CDP. En un segundo modelo, se propone la activación de factores de transcripción que reprimen la expresión de los genes tardíos en las células basales. Ambos modelos coinciden en que el número de copias es controlado por los niveles de las proteínas E1 y E2 activos en las células (Narahari, 2000).

El efecto directo de los oncogenes víricos sobre las células epiteliales del cérvix inicia una serie de cambios progresivos que alteran las funciones normales del ciclo celular, de la apoptosis y diferenciación, tales alteraciones pueden incrementar la susceptibilidad de la célula a sufrir daños en el DNA e inestabilidad cromosómica, estas alteraciones frecuentemente están acompañadas de la integración del genoma vírico en el genoma celular, lo que garantiza la expresión perpetua de los oncogenes víricos.

La regulación de la transcripción de los genes víricos es un proceso muy complejo, esto se debe a la presencia de múltiples promotores y patrones de splicing dentro de los transcritos, muchos virus de DNA utilizan el splicing en el mRNA, como un mecanismo para regular la expresión de sus genes. El procesamiento de un intrón dentro del marco de lectura de E6 puede modular la expresión de los genes E1 y E2 debido a que el splicing se sitúa arriba de la secuencia codificante para estos genes. De esta forma el procesamiento en el marco de lectura de E6 puede incrementar el espacio intergénico en estos genes, aumentando la eficiencia de la traducción. En el caso de E6 y E7 solo los VPH de alto riesgo presentan transcritos bicistrónicos y policistrónicos para estos genes, a diferencia de los VPH de bajo riesgo, donde sus transcritos son monocistrónicos, lo que podría representar un posible mecanismo de regulación, al observarse que en las proteínas codificadas por transcritos policistrónicos el segundo y tercer gen se traducen con menos eficiencia (Smotkin, 1989).

Así, los datos acumulados sugieren que los mecanismos detectados en la carcinogénesis asociada al cáncer cervicouterino pueden ser similares a los involucrados en la carcinogénesis bronquial. Si bien estos virus poseen la capacidad para inducir la carcinogénesis por sí solos, la infección per se no es suficiente para promover la transformación maligna, es necesaria la presencia de otros factores que contribuyen al desarrollo del cáncer, invariablemente la respuesta del huésped a la infección (Höpfl, 2000).

2.12. Respuesta del huésped a la infección por VPH

Los VPHs de alto riesgo, particularmente VPH 16, son cosmopolitas dentro de todas las poblaciones humanas, y la infección es transmitida comúnmente por contacto sexual, incluyendo el sexo oral según nuestra hipótesis, conduciendo a las displasias escamosas intraepiteliales de bajo grado en el caso del epitelio cervical uterino, la mayoría de estas lesiones desaparecen dentro de los primeros 6 a 12 meses seguramente debido a la intervención inmunológica. Solo un pequeño porcentaje de estas lesiones persisten y progresan a displasias intraepiteliales de alto grado, carcinoma in situ y finalmente sin

control, a carcinoma o adenocarcinoma de cérvix, o según nuestra hipótesis y de otros autores a lesiones similares en el epitelio bronquial.

La intervención del sistema inmune en el control de esta infección es ineludible ya que se aprecia una elevada incidencia y prolongada persistencia de displasias de bajo grado en mujeres inmunosuprimidas. Por otro lado, existe evidencia de respuesta inmune celular y humoral contra antígenos de VPH durante el curso de lesiones que revierten (Höpfl, 2000).

La evasión del sistema inmune, en las displasias de alto grado, carcinoma in situ y finalmente carcinoma o adenocarcinoma parece depender de diferentes modificaciones del sistema celular de presentación de antígenos que puede involucrar el sistema de transportación desde el proteosoma, el sistema HLA y los receptores de las células T (TCR). En consecuencia, la evasión del sistema inmune es un paso importante en la progresión de los tumores ligados a los VPH de alto riesgo (Höpfl, 2000).

Existen dos modos de control de la proliferación de células infectadas por VPH, para protegerlas de la transformación maligna. El primero involucra la inhibición de la función de las oncoproteínas virales y el segundo involucra el control transcripcional. La evidencia de que las células del huésped pueden inhabilitar la función de las oncoproteínas es aún indirecta y existe solamente información para el bloqueo de E6. En líneas celulares que han sido transfectadas con DNA de E6, el gen CDKN2A (el cual codifica el inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas, INK4A) es comúnmente inactivado por metilación, mutación o delección. El INK4A inactiva los complejos ciclina D1-Cdk4 ó ciclina D1-Cdk6, lo cual previene la expresión de la ciclina E y, por lo tanto, la progresión del ciclo celular. La constante interrupción de la función del gen CDKN2A en células immortalizadas por E6 indica que INK4A puede interferir funcionalmente con la actividad transformante de E6. La expresión de E7 puede superar este bloqueo ya que directamente estimula la expresión de ciclinas A y E a través de su interacción con Rb. Aún más en células que son immortalizadas por E6 y E7, el gen CDKN2A permanece intacto. No hay evidencia firme que indique una interferencia negativa de otros

inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas tales como WAF1 (p21) y KIP1 (p27) contra E7 ya que estos están inhibidos.

Otra vía ha sido analizada con más detalle, la cual involucra el bloqueo de la transcripción del DNA de VPH y es conocida con el concepto del factor de interferencia celular (CIF), el cual es activado por estimulación parácrina de células epiteliales cervicales por macrófagos y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y causa numerosos efectos en células inmortalizadas por VPH, los cuales incluyen una modificación del factor de transcripción AP1, el cual es esencial para la expresión génica del VPH y la inducción de la síntesis endógena del interferón antiviral γ los cambios en la composición de AP1 median la supresión de la transcripción de los VPHs de alto riesgo. Tales vías no están funcionales en las células neoplásicas del cérvix lo que indica que la cascada de señalización mediada por TNF α es interrumpida durante la transformación neoplásica (Bachmann, 2002; Rösl, 1997; Soto, 1999).

Sin duda, la inmunosupresión representa un factor de riesgo para la persistencia del DNA viral y la progresión de la lesión pero los factores que determinan la persistencia viral en mujeres no inmunosuprimidas no están completamente definidos. Se ha invocado la modificación de genes celulares específicos durante el curso de la transformación viral, el efecto sinérgico carcinogénico de agentes físicos y químicos, y la existencia de predisposición genética para el cáncer cervicouterino, sin que los genes involucrados en esta predisposición hayan sido identificados (Figura 9) (zur Hausen, 1989; Magnusson, 1999).

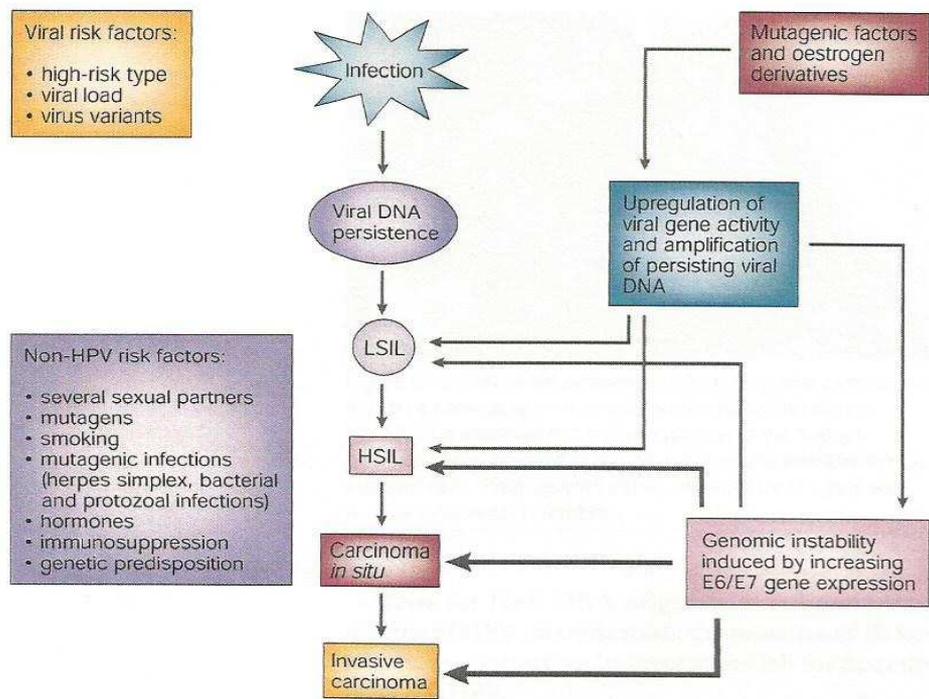


Figura 9. Factores de riesgo asociados a la progresión tumoral por el VPH.

3. JUSTIFICACION

No se ha establecido una aclaración sobre las causas que expliquen la tendencia creciente del cáncer pulmonar en México. Tales causas pueden englobarse en dos grupos: en el primero están aquellas causas no asociadas con un incremento real en el riesgo de desarrollar la enfermedad como son, un mejor diagnóstico y el crecimiento acelerado de la población en las edades adulta y avanzada, características de la población mexicana durante los últimos años.

En el segundo grupo se encontrarían las causas asociadas a un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer pulmonar como serían la mayor intensidad del tabaquismo ó una mayor exposición de la población a otros factores de riesgo ya conocidos como la contaminación ambiental, el humo de leña, asbestos, etc. ó a etiologías hasta hoy no establecidas plenamente, como serían las posibles causas virales.

Por lo tanto es necesario que generemos y nos apropiemos de conocimiento acerca de la célula cancerosa y su microambiente, proponiendo establecer una relación etiológica entre esta patología y los virus, en este caso los VPHs de alto riesgo 16/18 dada su ubicación cosmopolita y que son considerados de transmisión sexual, con el fin de proponer al respecto posibles conductas preventivas y diagnósticas oportunas sobre esta patología, tratando de hacer una vinculación efectiva entre la investigación, actualización y docencia.

4. HIPÓTESIS

Los virus del papiloma humano de alto riesgo tipo 16/18 están presentes en tejido pulmonar de pacientes con cáncer pulmonar.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Buscar la presencia de secuencias específicas de la región L1 y productos del gen E6/E7 de papilomavirus humanos (VPH) de alto riesgo tipo 16/18 en el DNA genómico y en tejidos de pacientes con cáncer broncogénico.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Buscar secuencias específicas de la región L1 y E6 de VPH tipo 16/18 en líneas celulares HeLa y SiHa mediante PCR.
- 2.- Buscar secuencias específicas de la región L1 y del gen E6 de VPH tipo 16/18 en pacientes con cáncer pulmonar y en otras patologías de pulmón mediante una segunda PCR.
- 3.- Detectar DNA de los VPH de alto riesgo 16/18 en tejidos de pacientes con cáncer pulmonar y en otras patologías pulmonares mediante hibridación *in situ* (ISH).
- 4.- Comparar las secuencias obtenidas de las PCR con las secuencias reportadas de VPH 16/18 en el GenBank.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Recolección de muestras

Un total de 39 muestras de tejido de cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) fueron obtenidas de respectivos pacientes atendidos en el Hospital General, Zacatecas “Luz González Cosío”, de los cuales 25 eran del género masculino y 14 del femenino, todos ellos con clasificación TNM en estadio IV y sin ningún tipo de tratamiento previo. El rango de edad fue de 47 a 79 años, con una media de 55 años. La prevalencia de hábito tabáquico fue positiva en 27 (69.2%) pacientes.

Adicionalmente fueron recolectadas 20 muestras de tejido pulmonar de otras patologías respiratorias y usadas como controles negativos. Todas las muestras fueron obtenidas mediante diversos procedimientos invasivos que comprenden desde la biopsia pulmonar transtorácica con aguja de Chiba 22 Fr, biopsia pleural transtorácica con agujas de Abrams o de Cope, la fibrobroncoscopia para lavado broncoalveolar, cepillado y toma de biopsia bronquial hasta la biopsia pulmonar “a cielo abierto” mediante cirugía torácica.

Las muestras fueron conservadas en RNA later (QIAGEN, Hilden, Alemania) y procesadas en parafina para someterlas a cortes histológicos de 4 μ de espesor, para realizarles la tinción de hematoxilina-eosina y sometidas a diagnóstico histológico examinadas por dos patólogos en estudio doble ciego. Cortes adicionales se utilizaron para los procedimientos motivo de este estudio, extracción de DNA genómico, PCR, hibridación *in situ* (ISH), inmunohistoquímica (IHQ). Otra porción del tejido se almacenó a -30° C hasta la extracción del DNA.

En todos los casos hubo previo consentimiento informado por escrito del paciente, así como la autorización para la realización de este protocolo emitida por el comité de Ética e investigación del Hospital General, Zacatecas, “Luz González Cosío” y observando en

todo momento los postulados de la declaración de Helsinki, así como la normatividad de la ley general de salud en lo referente a la investigación en seres humanos.

Se obtuvieron líneas celulares SiHa y HeLa del American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) las cuales fueron cultivadas y mantenidas en medio de Dulbecco modificado de Eagle (DMEMF-12; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) suplementado con suero fetal bovino al 10%, adicionado con penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100mg/ml (Gibco, Grand Island, NY, USA). Las líneas celulares fueron incubadas en una cámara de humidificación a una atmósfera de O₂ al 95% y CO₂ al 5% a 37°C y fueron usadas como controles positivos.

6.2. Extracción de DNA genómico

El DNA fue extraído de biopsias utilizando aproximadamente 25 – 50 mg de tejido que se depositaron en tubos eppendorf bajo condiciones de esterilidad, igualmente la extracción del DNA del liquido de los lavados bronco alveolares fue bajo las mismas condiciones, con 100 µl de liquido más 200 µl de Buffer TE 1X estéril.

Las biopsias fueron sometidas a la acción del buffer de lisis (200 µl Buffer TE 1X estéril, 200 µl de SDS 10% y 5 µl de proteinasa K 20 mg/ml), se incubó a 55 °C durante toda la noche y al terminar se agregó 150 µl de Buffer P3 (kit de extracción de DNA de QIAGEN, Hilden, Alemania) (acetato de sodio) y se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 min.

Se tomó el sobrenadante depositándolo en un eppendorf estéril 1.5 ml y se agregan 400 µl de isopropanol absoluto frío (-20 °C) (SIGMA, Missouri, USA) agitándolo por inversión. Se centrifugó por segunda vez a 14 mil rpm durante 15 min. Y se decanta nuevamente descartando el sobrenadante. La pastilla precipitada se lavó en dos ocasiones mediante inversión con 200 µl de etanol frío (-20 °C) al 70%, centrifugándose nuevamente a 14 mil rpm durante 5 min y se eliminó el etanol mediante evaporación. El DNA de las líneas celulares y de los líquidos de lavados broncoalveolares fue extraído

usando DNAzol genomic DNA isolation reagent (Molecular Research Center Inc., Cincinnati Oh, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La concentración del DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) extraído fue determinado por medio de la absorbancia obtenida de una dilución 1:100 de cada muestra en agua mili-Q, a una longitud de onda 260 nm en espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 (Buckinghamshire, UK) (Salazar y cols., 2013).

6.3. Detección de secuencias de VPH mediante PCR

Inicialmente la calidad del DNA genómico fue evaluada mediante una PCR punto final del gen constitutivo de la β -globina utilizando un par de “primers” específicos que amplificaron un fragmento de 192 pb. El par de “primers” utilizado fue el PCO3/PCO4 cuyas secuencias fueron: 5'-ACACAACCTGTGTTCACTAGC-3' (forward) y 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3' (reverse). Se preparó la reacción en un volumen final de 25 μl , utilizando 2.5 μl de Buffer de PCR 10X (INVITROGEN, BRAZIL), 0.5 μl de cada “primer” (100 ng/ μl), 0.5 de DNTP's (10 mM de cada uno) (INVITROGEN, Carlsbad, California, USA), 0.5 μl de Taq polimerasa 5U/ μl (INVITROGEN, BRAZIL), 18.5 μl de agua mili-Q (Millipore) y 1 μl de la muestra a concentración de 250 ng/ μl . Las muestras se colocaron en eppendorfs de 200 μl en un termociclador (MJ Research PTC-200, Minnesota, USA). (Aguayo, 2007; Castillo, 2006) bajo el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 4 min, 40 ciclos de 95 °C por 1 min, 52 °C por 1 min, 72 °C por 2 min, con una extensión final de 5 min a 72 °C (Castillo, 2006; Salazar *et al.*, 2013).

6.4. Detección de genomas de los VPHs en el DNA genómico

Se efectuó una PCR punto final utilizando los “primers” GP5+/GP6+ específicos para la región L1 altamente conservada de 23 genotipos de VPH's mucosotrópicos entre otros, los tipos 6, 11, 16, 18, 31, y 33 algunos de ellos objetivos de este trabajo, (“primer” sentido 5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3' y “primer” anti-sentido 5'-

GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3`) generando productos de 150 pb. Las condiciones de amplificación fueron: 94 °C durante 2 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 45 seg, 66 °C por 5 seg, 71 °C por 1.5 min. y extensión final de 10 min. a 72 °C (Castillo, 2006; de Roda, 1995; Salazar *et al.*, 2013).

6.5. Detección de VPHs tipo 16 y 18

Para confirmar la detección de los VPH's tipo 16 y 18 se efectuó una nueva PCR usando "primers" específicos para VPH 16 y 18 para generar los productos de amplificación de 227 pb y 194 pb respectivamente:

VPH 16 sentido 5´- TACTAACTTTAAGGAGTACC-3´

VPH 16 anti-sentido 5´- GTGTATGTTTTTGACAAGCAATT-3´

VPH 18 sentido 5´- CCAAATTTAAGCAGTATAGC-3´

VPH 18 anti-sentido 5´- TTGTACAAAACGATATGTATCCA -3´

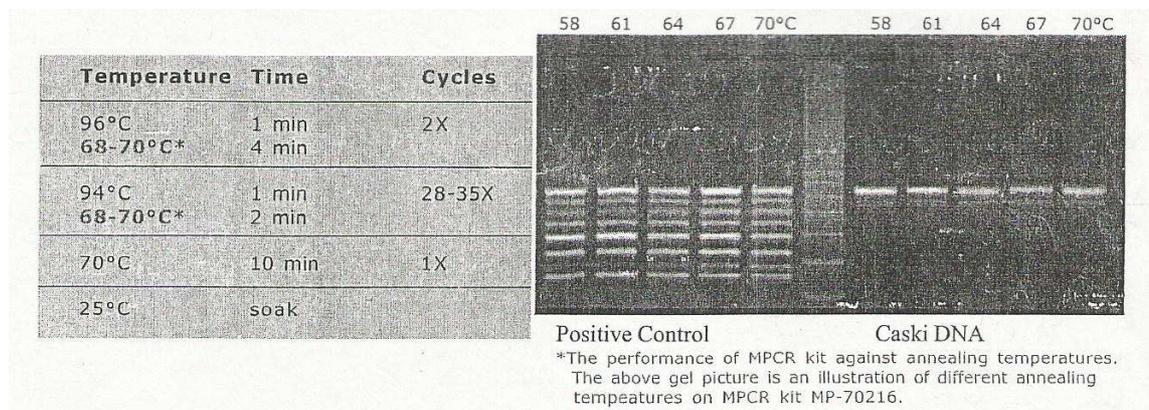
La amplificación fue realizada usando las siguientes especificaciones: 94 °C por 4 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 50 °C por 50 seg, 72 °C por 40 seg, y 72 °C por 5 minutos (Fei, 2006; Salazar *et al.*, 2013).

6.6. Amplificación simultánea del gen específico E6 de diversos tipos de VPHs

Se realizó una PCR múltiple utilizando un MPCR kit for Human Papilloma Virus set 2 (Maxim Biotech, Inc. So. San Francisco, CA, USA). Tal kit está diseñado para dirigir la amplificación simultánea del gen específico E6 de los VPH's tipo 6, 11, 16, 18, 31, 33, 52 y 58.

El volumen final de la reacción fue de 25 µl, utilizando 12.5 µl de Buffer MPCR 2X, 2.5 µl de "primers" MPCR 10X, 0.25 µl de Taq DNA pol (5U/µl), 2.5 µl de la muestra de DNA genómico (250 ng/µl), 7.25 µl de agua mili-Q. Las mezclas se colocaron en eppendorfs en un termociclador DNA Engine. MJ Research PTC-200 de acuerdo al siguiente programa sugerido por el fabricante (Tabla 1).

Tabla 1. Programa para la MPCR diseñado para dirigir la amplificación simultánea del gen específico de E6 de los VPH's tipo 6, 11, 16, 18, 31, 33, 52 y 58.



Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis usando gel de agarosa (Bioline, Massachusetts, USA) al 1.2 %, en Buffer SB 1X, teñido con bromuro de etidio (SIGMA, Missouri, USA). Las muestras se corrieron a 90 v durante 40 a 50 minutos, visualizando el avance de las bandas, seguidamente fueron foto-documentadas bajo luz ultravioleta (Gel-PRO) (Chamberlain, 1994; Salazar *et al.*, 2013).

6.7. Electroforesis

En cada proceso de PCR, los amplicones fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa (Bioline, Massachusetts, USA) a concentración del 1.2 %, utilizando Buffer SB 1X y teñido con bromuro de etidio (Sigma, Missouri, EUA), cargando 6 µl de muestra y 4 µl de buffer de carga. Las muestras se corrieron a 100 v durante un periodo de 30 a 50 minutos dependiendo de la separación de las bandas y finalmente se efectuó su foto documentación.

6.8. Secuenciación

Los productos purificados de PCR fueron enviados a secuenciación automatizada, utilizando los “primers” específicos sentido y antisentido VPH 16 y 18, analizados mediante ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

Las secuencias fueron comparadas con genomas depositados en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank usando el programa BLAST encontrando una homología del 100%. (Salazar y cols., 2013).

6.9. Hibridación *in situ* (ISH)

Se efectuó hibridación *in situ* para detectar DNA de los VPH tipo 16 y 18 usando sondas oligonucleotídicas marcadas con biotina (Pan Path, Amsterdam, Netherlands) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Brevemente, se desparafinaron e hidrataron los cortes histológicos de 4 μm de espesor, se inactivó la peroxidasa endógena y la fosfatasa alcalina mediante H_2O_2 y levamizol respectivamente, posteriormente fueron sometidos a digestión con pepsina y lavados con PBS y deshidratados con alcohol en forma progresiva. La desnaturalización e hibridación de los cortes fue realizada aplicando a cada espécimen, una gota (20 μl) de la sonda DNA marcada con biotina, incubando las laminillas en una cámara humidificadora a 95 °C durante 5 min y posteriormente en un medio húmedo durante 16 hs a 37 °C. Acto seguido fueron lavados con buffer TBS.

La detección fue realizada aplicando el conjugado de anticuerpo anti-biotina y peroxidasa de rábano agregando dos gotas (40 μl) de la solución de trabajo AEC. Las laminillas fueron incubadas en la obscuridad, para permitir el desarrollo de la señal y finalmente se empleó el methyl-green como contratinción (Wilkinson D, 1995; Salazar *et al.*, 2013).

6.10. Estrategia experimental



7. RESULTADOS

7.1. Presencia de secuencias de VPH tipos 16 y 18 en el DNA genómico extraído de las muestras de tejidos pulmonares

Para verificar la calidad del DNA genómico extraído tanto de las muestras problema (39 casos) como de los controles negativos (20 muestras) y de las células HeLa y SiHa usadas como controles positivos, se realizó una PCR para amplificar el gen constitutivo control, el de la β -globina, donde todas las muestras mostraron una amplificación exitosa de un producto de 192 pb (Figura 10).

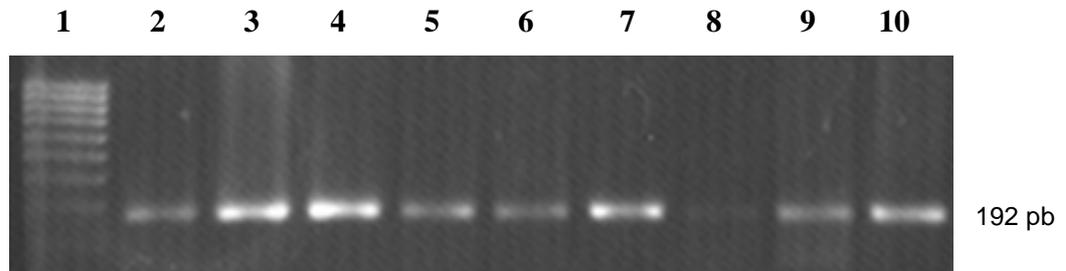


Figura 10. Productos de PCR de las muestras de pacientes con cáncer pulmonar y otras patologías pulmonares, así como de las líneas celulares SiHa y HeLa, usando “primers” específicos para β -globina: Carril 1 marcador de peso molecular; carril del 2 al 7 muestras problema; carril 8 control negativo con agua; carril 9 línea celular HeLa; carril 10 línea celular SiHa.

Para la detección de las secuencias de la región L1 de VPHs tanto en las muestras problema, como en las de los controles, se efectuó un tamizaje mediante una PCR utilizando los “primers” específicos GP5+/GP6+ ya descritos, originando productos de amplificación de 150 pb en 16 muestras problema (41%), de las 39 muestras originales. Solamente se obtuvo positividad en la amplificación en 2 casos control (10%) de los 20 casos (Figura 11).

De los casos positivos para VPHs, 9 de ellos (56%) pertenecieron al género masculino, el resto de ellos, 7 casos (44%) al género femenino.

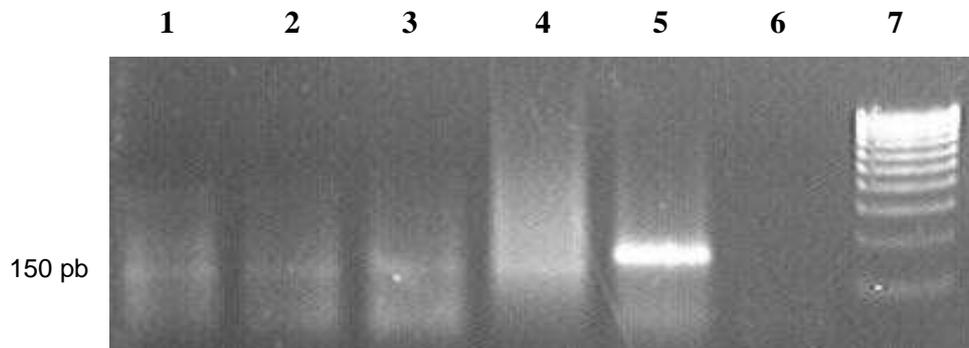


Figura 11. Productos de PCR de las muestras de pacientes con cáncer pulmonar y otras patologías pulmonares, así como de la línea celular SiHa, usando “primers” específicos GP5+/GP6+: Carril 1 y 2 carcinoma epidermoide . Carril 3 y 4 adenocarcinoma. Carril 5 línea celular SiHa. Carril 6 control negativo. Carril 7 marcador de peso molecular.

De las 16 muestras positivas se efectuó una segunda PCR usando “primers” específicos para VPH 16 y 18 donde se amplificaron los productos esperados de 226 pb y 194 pb respectivamente.

Quince muestras problema (93.75%), al igual que 2 muestras control (10%) y las células SiHa, resultaron positivas para secuencias de VPH 16 (Figura 12 a y b) y solamente una muestra (6.25%) al igual que las células control HeLa fueron encontradas positivas a secuencias de VPH 18 (Figura 13).

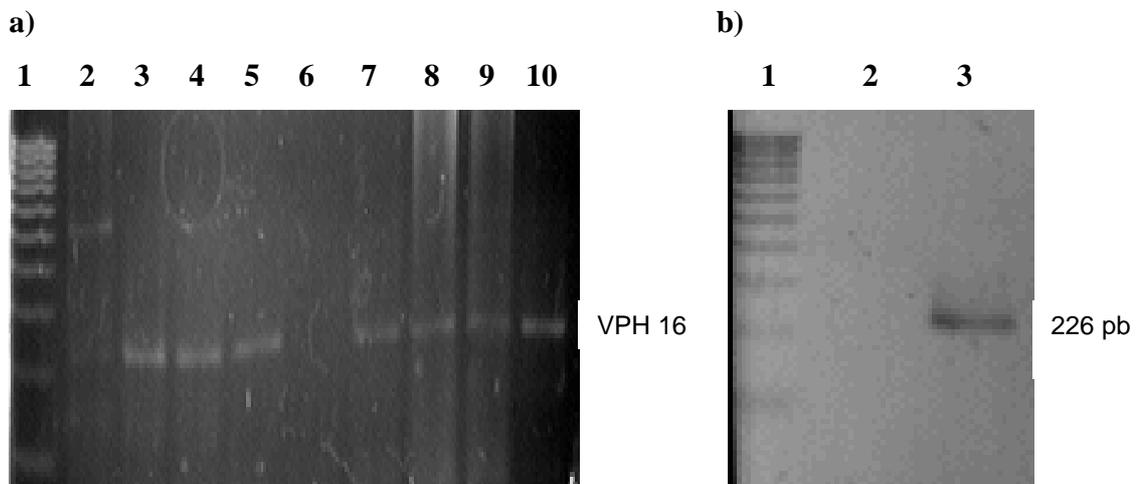


Figura 12. a).- Productos de PCR de las muestras de pacientes con cáncer pulmonar y otras patologías pulmonares, utilizando “primers” específicos para VPH 16. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: muestra control, carril 3 al 10: muestras de cáncer broncogénico. b).- Producto de PCR de la línea celular SiHa, usando “primers” específicos para VPH 16. Carril 1: MPM, carril 2: control negativo con agua, carril 3: control positivo línea celular SiHa.

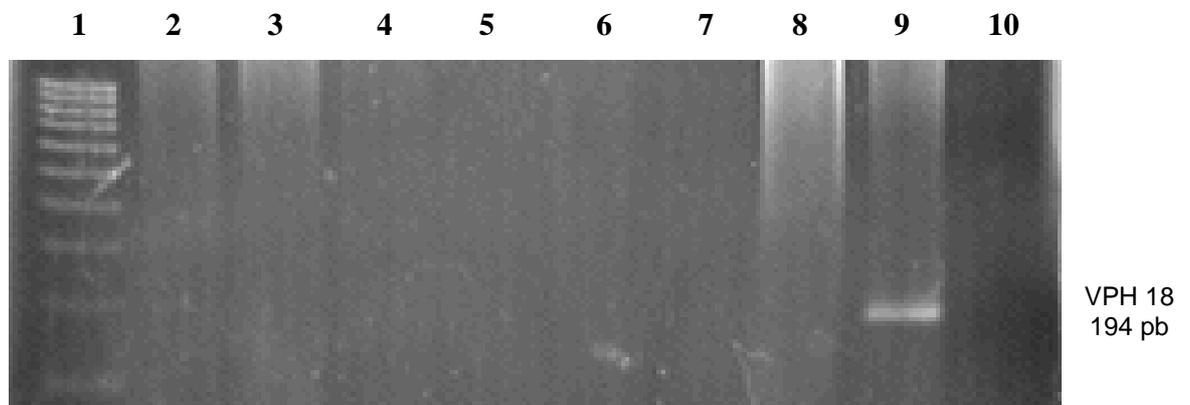


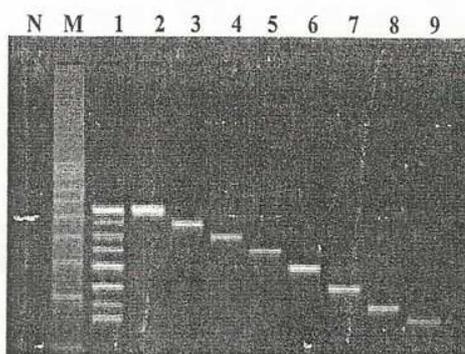
Figura 13. Productos de PCR de las muestras de pacientes con cáncer pulmonar y otras patologías pulmonares, utilizando “primers” específicos para VPH 18. Carril 1: MPM, carril 2 al 9: muestras de cáncer broncogénico, carril 10: control negativo.

Complementariamente se efectuó una PCR múltiple (MPCR) para evidenciar la amplificación simultánea del gen específico de E6 de los VPH’s tipo 6, 11, 16, 18, 31, 33, 52 y 58, encontrándose en varios pacientes coexistencia de dos tipos de VPH (Tabla 2 y Figura 14).

Tabla 2. Control de calidad de la MPCR para el gen específico de E6 de los VPH's tipo 6, 11, 16, 18, 31, 33, 52 y 58 y especificación de los amplicones esperados.

MPCR PRIMER INFORMATION

Product Code	Gene	5'/3' Tm	Amplicon Size	Accession No.	Intron Span	Genomic Size
HPV-E06P	Viral HPV-6	66°C/69°C	184 bp	NC_000904	no	184 bp
HPV-E11P	Viral HPV-11	67°C/65°C	233 bp	NC_001525	no	233 bp
HPV-E16P	Viral HPV-16	72°C/73°C	556 bp	NC_001526	no	556 bp
HPV-E18P	Viral HPV-18	69°C/67°C	475 bp	NC_001357	no	475 bp
HPV-E31P	Viral HPV-31	72°C/73°C	340 bp	NC_001527	no	340 bp
HPV-E33P	Viral HPV-33	72°C/73°C	413 bp	NC_001528	no	413 bp
HPV-E52P	Viral HPV-52	70°C/69°C	155 bp	NC_001592	no	155 bp
HPV-E58P	Viral HPV-58	70°C/70°C	295 bp	NC_001443	no	295 bp



Lane N: PCR using HPV MPCR Primers without positive (Negative).

Lane M: DNA M.W. Marker

Lane 1: PCR using HPV MPCR Primers with 1X positive

Lane 2: PCR using HPV-16 Primers with 1X positive

Lane 3: PCR using HPV-18 Primers with 1X positive

Lane 4: PCR using HPV-33 Primers with 1X positive

Lane 5: PCR using HPV-31 Primers with 1X positive

Lane 6: PCR using HPV-58 Primers with 1X positive

Lane 7: PCR using HPV-11 Primers with 1X positive

Lane 8: PCR using HPV-6 Primers with 1X positive

Lane 9: PCR using HPV-52 Primers with 1X positive

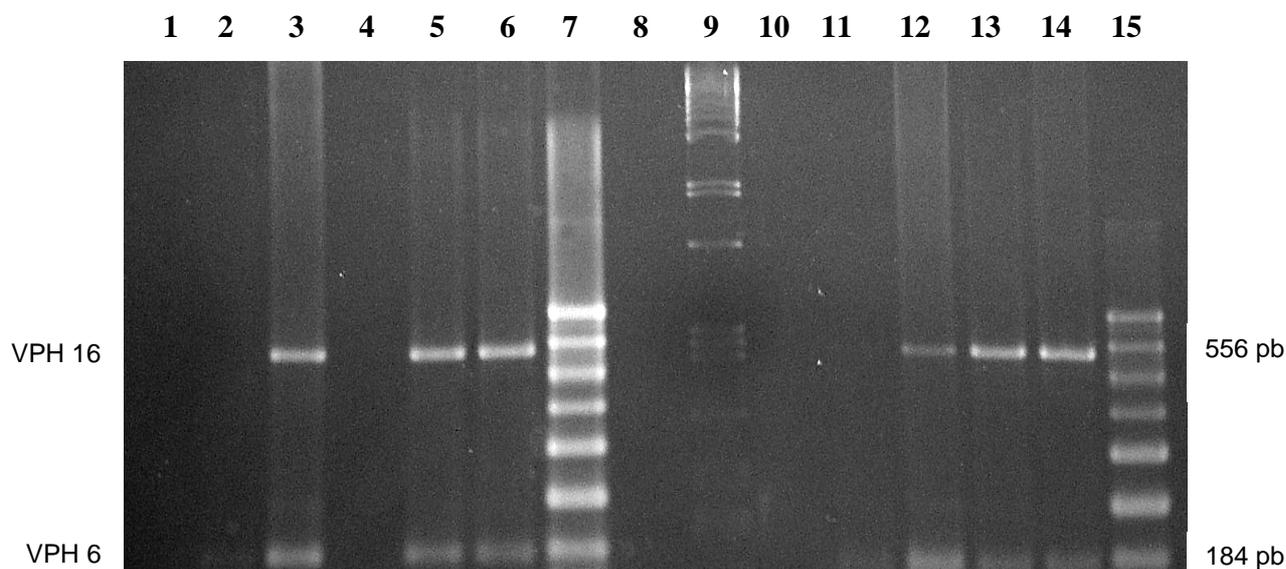


Figura 14. Productos de MPCR de las muestras de pacientes con cáncer pulmonar y otras patologías pulmonares. Carril 1: neumonía, carril 2: cuerpo extraño, carril 3: empiema, Carriles 4, 5 y 6 adenocarcinomas, carril 7: control positivo de MPCR, carril 8: control negativo de MPCR, carril 9: PM Lambda PST, carril 10, 11, 12, 13 y 14 carcinoma epidermoide, carril 15: control positivo de MPCR.

De los productos de PCR donde se emplearon “primers” específicos para VPH 16 y 18, dos de los amplicones positivos para VPH 16 y el único positivo a VPH 18, fueron secuenciados para confirmar su identidad en el Genbank, apreciándose que las dos secuencias correspondientes a VPH 16 tuvieron un 100% de homología con la secuencia HM596523 (VPH 16), y el único positivo a VPH 18 su secuencia también tuvo una homología del 100% con la secuencia GQ180792 (VPH 18) (Figura 15).

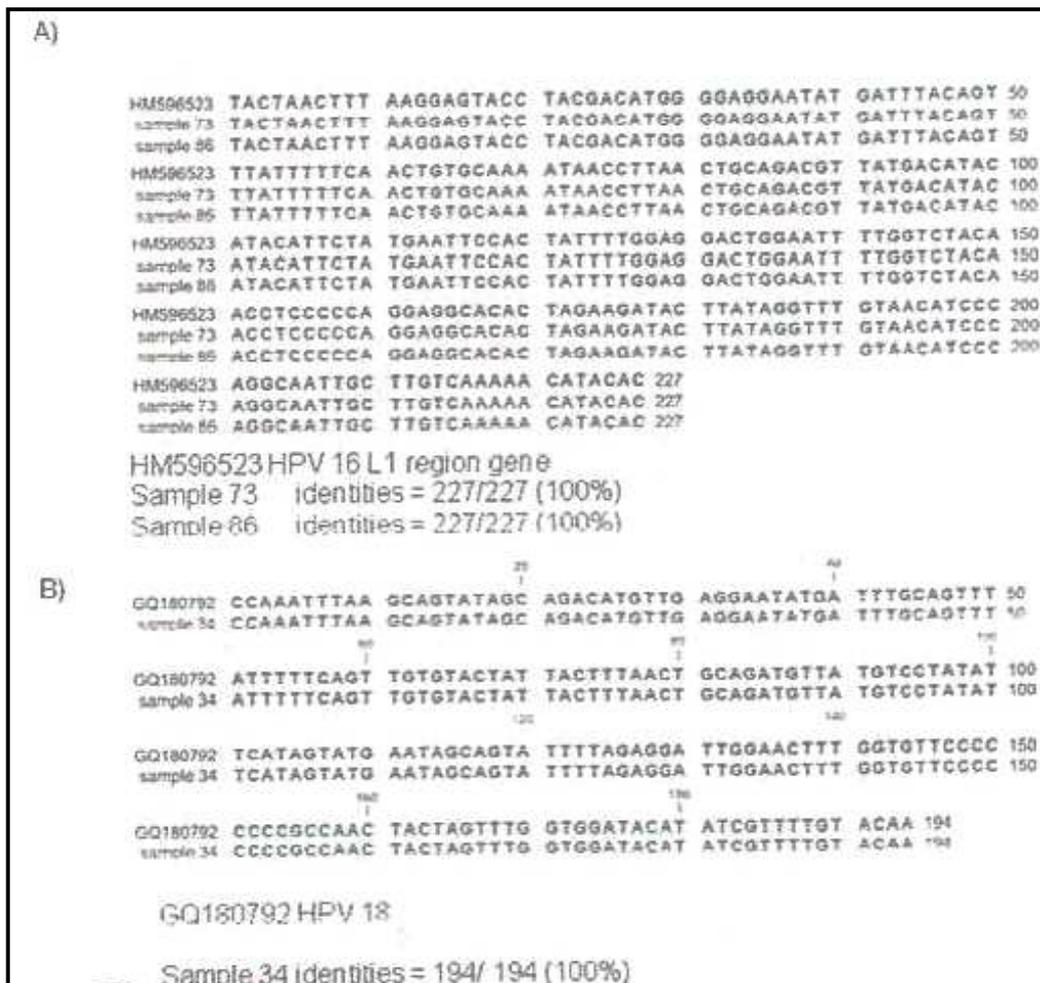


Figura 15. Secuenciación de muestras representativas positivas a VPH 16/18. Las muestras 73 y 86 corresponden a positivas para VPH 16. La muestra 34 corresponde a muestra positiva a VPH 18.

7.2. Presencia de DNA de VPHs en muestras de cáncer pulmonar confirmada por hibridación *in situ*

Para confirmar la presencia de secuencias de VPH en tejidos neoplásicos y controles se realizó una hibridación *in situ* (ISH), utilizando sondas específicas marcadas con biotina. Los resultados mostraron que 13/16 muestras de cáncer pulmonar fueron positivas por ISH, para secuencias VPH 16/18, es decir un 81.25%.

La distribución de las señales que revelan la presencia de DNA de HPV estuvo confinada solamente en las células malignas, estando ausente en las células normales adyacentes (Figuras 16 y 17).

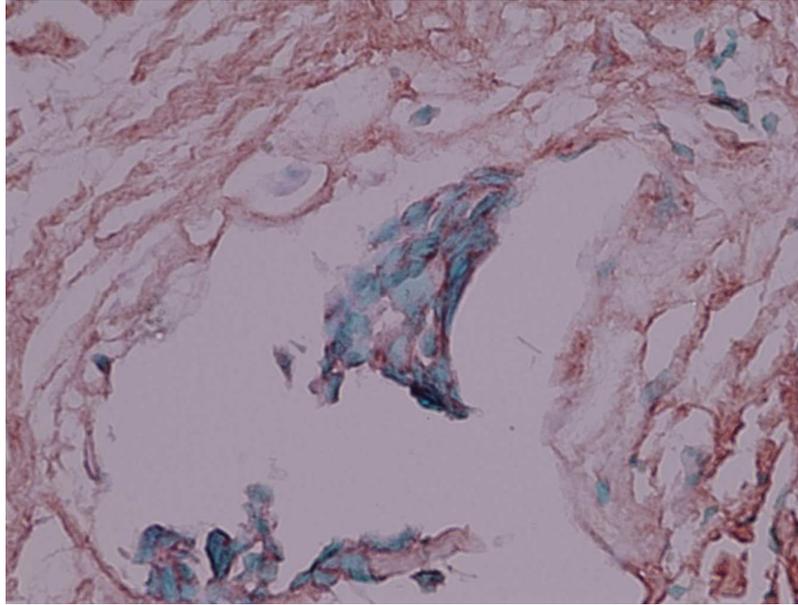


Figura 16. Hibridación *in situ* positiva a VPH 16, mediante sondas Pan-Path^R contrateñida con metilgreen, donde se aprecia la señal que revela la presencia de DNA en las células malignas, pero no en las células normales adyacentes, carcinoma epidermoide (40X).

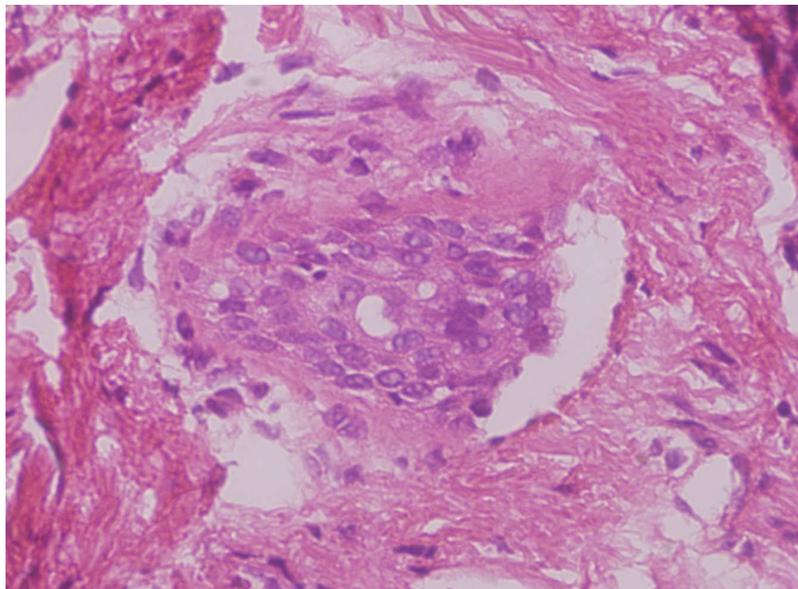


Figura 17. Hibridación *in situ* positiva a VPH 16 en adenocarcinoma, mediante sondas Pan-Path^R sin contrateñición, donde se aprecia la señal que revela la presencia de DNA en las células malignas, pero no en las células normales adyacentes (40X).

Con respecto a la clasificación histopatológica de los casos positivos a cáncer broncogénico, 18 de esos (46.15%) se clasificaron como adenocarcinomas, mientras que el resto, 21 (53.84%) fueron clasificados como carcinomas epidermoides ó de células escamosas. (Tabla 3) (Figuras 18 y 19 respectivamente).

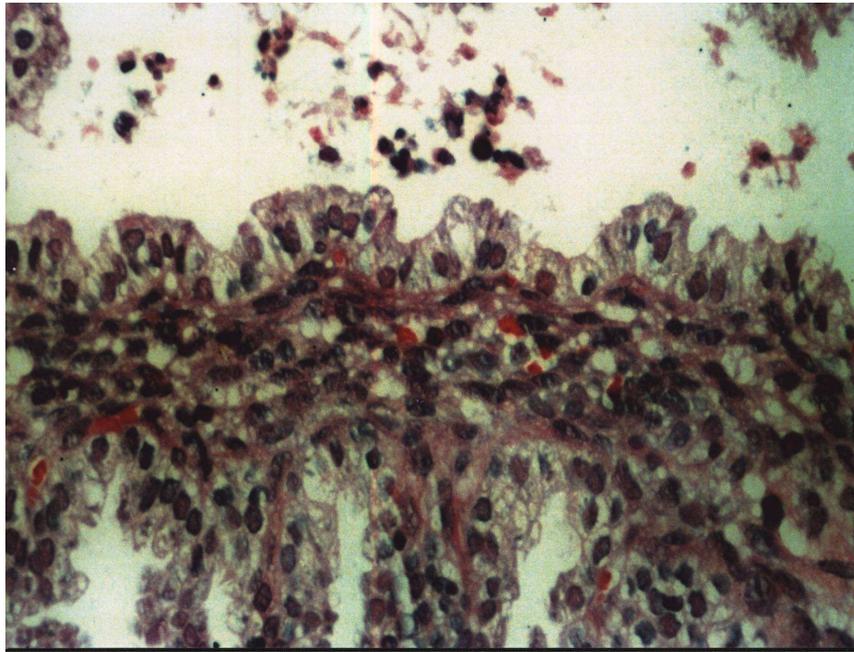


Figura 18. Biopsia pulmonar de adenocarcinoma. HyE (40X).

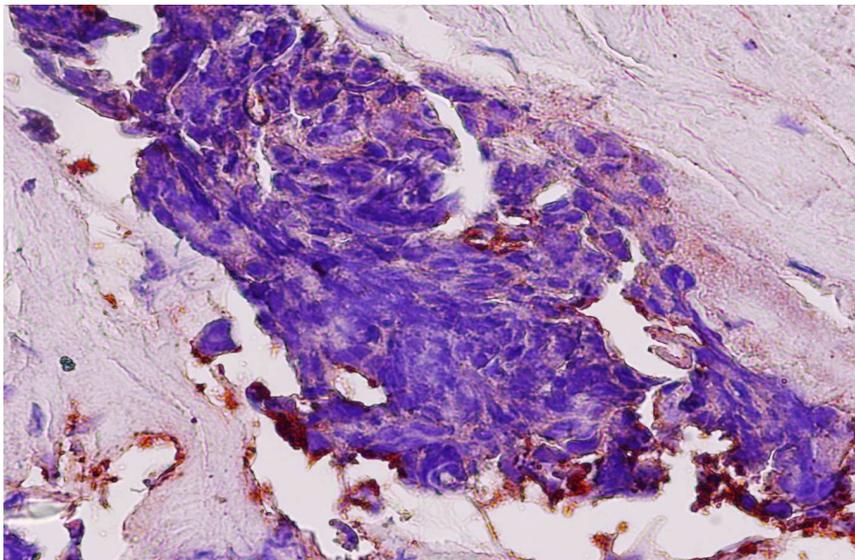


Figura 19. Biopsia pulmonar (carcinoma epidermoide). HyE (40X).

En 6 (28.5%) de los 21 (6/21) casos de carcinoma epidermoide y en 10 (55.5%) de los 18 (10/18) casos de adenocarcinoma se detectaron secuencias de VPHs, siendo más frecuentemente encontrado el VPH 16, ya que solamente uno de los casos fue positivo para secuencias del VPH 18, encontrado en un paciente diagnosticado con carcinoma variedad epidermoide.

Solamente en 2 de los 20 casos control –muestras pulmonares de pacientes con otra patología pulmonar no neoplásica- se encontraron secuencias de VPH, siendo el tipo 16 el encontrado.

Tabla 3. Hallazgos clínicos.

	Carcinoma epidermoide	AC	<i>p-value</i> ¹
	# (%)	# (%)	
TOTAL ²	21 (100)	18 (100)	
Genero			
Masculino	16 (76)	9 (50)	0.1083
Femenino	5 (24)	9 (50)	
Tabaquismo			
Fumador	15 (71)	12 (67)	1.0
No Fumador	6 (29)	6 (33)	
Tipo de VPH			
VPH 16	5 (24)	10 (56)	0.375
VPH 18	1 (5)	0 (0)	
ISH			
ISH +	6 (29)	7 (39)	0.5196
ISH -	15 (71)	11 (61)	

¹ = Diferencia entre AC y CE fue obtenida mediante prueba exacta de Fisher

² # (%) = Número y porcentaje de pacientes y tipo histológico.

C.E = Carcinoma de células escamosas; ACs = adenocarcinoma

8. DISCUSIÓN

Múltiples factores de riesgo han sido asociados al desarrollo del cáncer pulmonar, estableciéndose que el principal factor de riesgo es el tabaquismo, aunque otros factores pueden influenciar en su desarrollo, tales como la contaminación ambiental y laboral, factores genéticos, etc., (Hanahan D, 2000).

Sin embargo, no todos los fumadores desarrollarán cáncer broncogénico en su vida y, en adición estas neoplasias se desarrollan en pacientes que nunca han fumado e interesantemente estos tumores también han sido descritos en niños (Sun S, 2007; Syrjänen, 2002).

El posible involucramiento de los VPHs de alto riesgo en lesiones de células escamosas bronquiales fue primeramente sugerido por Syrjänen en 1977, desde entonces, numerosos estudios han confirmado la presencia de DNA de VPHs de alto riesgo en cáncer pulmonar, el rango de detección en adenocarcinomas de pulmón ha sido mucho mas bajo, y por otro lado muchos otros estudios han fracasado en demostrar la presencia de secuencias de DNA de HPVs (Syrjänen 1977; Cheng Y, 2001; Gorgoulis V, 1999). En cuanto a la prevalencia de infección por VPH de alto riesgo tipo 16 en pacientes con cáncer broncogénico en nuestro país, solamente existe un reporte de 15 casos donde dicha prevalencia es del 33% (Castillo *et al.*, 2005). Nuestros hallazgos de VPH tipo 16/18 en cáncer broncogénico, con prevalencia del 41%, muestran una clara predominancia del VPH tipo 16, considerando que la variación en porcentajes obedece probablemente a diferencias geográficas, de género, de edad, etc. Tales hallazgos concuerdan con los reportados en la literatura, en lo referente a frecuencia de la infección y porcentajes encontrados. Igualmente son concordantes en cuanto al tipo de VPH más frecuentemente encontrado que es el tipo 16 y predominando en la variedad histológica del adenocarcinoma. (Castillo *et al.*, 2005; Gorgoulis *et al.*, 1999; Fei *et al.*, 2006; Koshiol *et al.*, 2011).

En cuanto a estirpe histológica, la variedad predominante en nuestra serie de casos correspondió al carcinoma epidermoide (21/39 casos), dato que discrepa en la variedad predominante en la actualidad, que es el adenocarcinoma, sin embargo tal predominancia no es significativa.

Adicionalmente -los HPVs de alto riesgo son virus tipo DNA de doble cadena, epiteliotrópicos- los datos experimentales acumulados sugieren que los mecanismos carcinogénicos de los VPHs asociados a cáncer cervicouterino pueden también estar involucrados en la carcinogénesis bronquial (zur Hausen, 2002; zur Hausen, 2009; Syrjänen, 2002), **por esas razones nosotros hipotetizamos que el involucramiento de VPHs de alto riesgo 16/18 puede no estar restringido a carcinomas del cérvix uterino, sino que también puede estar asociado con cáncer pulmonar en la población mexicana.**

VPH puede infectar ambos epitelios el respiratorio y el del cérvix uterino, porque sus sitios preferentes de entrada en ellos son las células de metaplasia escamosa de las uniones escamoso-columnares donde los VPHs interactúan con la heparina, glicosaminoglicanos e integrinas alfa-6/beta-4 de la superficie celular. (de la Cruz, 2004; Syrjänen, 2002).

La presencia de uniones escamoso-columnares con áreas de metaplasia escamosa formadas de manera natural o yatrogénica en el epitelio respiratorio es considerada un pre-requisito para la diseminación de las infecciones bronquiales por VPH, y la causa más importante para la formación de estas uniones escamoso-columnares con áreas de metaplasia escamosa en los bronquios es el tabaquismo así, la situación en los bronquios con múltiples áreas de metaplasia escamosa es un reminisciente de esas zonas de transformación del cérvix uterino y los hallazgos histológicos son similares a los vistos en neoplasias de células escamosas de la vía aérea. (Syrjänen, 2002; zur Hausen, 2002).

Las alteraciones moleculares involucradas en la patogénesis por VPHs son causadas por las oncoproteínas E6 y E7, las cuales facilitan la transformación e inmortalización

celular. La oncoproteína E6 interactúa con la proteína supresora de tumores p53 acelerando su degradación proteasomal a través de la ubiquitin ligasa celular del huésped. (Barbosa, 1996) la oncoproteína E6 también incrementa la actividad de la telomerasa celular, predominantemente induciendo la transcripción del gen hTERT, donde la proteína hTERT resulta ser la subunidad catalítica del complejo de la enzima telomerasa -involucrada en sobrepasar el límite de Hayflick referente al número de reproducciones de cada célula- y selectivamente expresada en un pequeño grupo de células normales, como las células madre (stem cells), tejidos tumorales y líneas celulares derivadas de tumores (Barbosa,1996).

Con la inactivación o mutación de p53 no se modulara la transcripción y expresión de genes involucrados en el control del ciclo celular –como es el caso de las Cdk's, Myc, etc- ni se modulara la apoptosis – a través de los genes de la familia Bcl-2, Bax, Fas- en los casos de daño al genoma, lo que contribuirá a mantener el fenotipo maligno (Soini, 1996; Rangel, 2006).

La oncoproteína E7 inhibe la proteína pRb, igualmente a través de la vía ubiquitina-proteasoma, lo cual libera al factor de transcripción E2F lo que resulta en sobre-expresión de genes involucrados en la modulación positiva del ciclo celular como cdc 2, ciclinas A y E, pero también de INK4A (también conocido como p16) en efecto aparentemente contradictorio ya que este inhibidor es superado por la sobre-expresión de los genes de ciclinas A y E que ejerce E7, sin contar que E7 bloquea la función de los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas como WAF1 (conocido como p21) y KIP1 (conocido como p27).

De esta manera las oncoproteínas E6 y E7 actúan de manera sinérgica en la transformación maligna e immortalización celular: E6 previene la apoptosis – al degradar p53 y Bcl-2- que es inducida por altos niveles de E2F que sobre regula la expresión de INK4A, y E7 rescata a E6 de la inhibición por INK4A al sobre-expresar ciclinas A y E y bloquear inhibidores de cinasas dependientes de ciclina (Aguayo, 2007; Castillo, 2006; de la Cruz, 2004; zur Hausen, 2002).

La identificación de tipos específicos de papilomavirus como agentes causantes de algunos cánceres como el cervicouterino ha permitido el desarrollo de métodos nuevos para tamizaje y diagnóstico temprano de este cáncer, tales aplicaciones nos podrán permitir extrapolar estos conocimientos e iniciar **la búsqueda de marcadores tempranos en el diagnóstico de cáncer pulmonar**, tal como la detección de genomas, oncoproteínas virales, o proteínas celulares que son inducidas en respuesta a la infección por VPHs de alto riesgo, a través de PCR, ISH, IHQ **en citología de expectoración ó detección en suero** de algunas de ellas, a través de sondas moleculares disponibles en kits comerciales ó que podamos diseñar ya que el diagnóstico temprano en cáncer pulmonar sigue constituyendo su “talón de Aquiles”. En este contexto emerge INK4A como un fuerte candidato para marcador temprano en pacientes con riesgo de cáncer pulmonar, pudiendo ser detectado a través de IHQ en citología de expectoración.

La ruta de transmisión de los VPHs detectados en cáncer pulmonar es aún incierta, aunque los estudios de cánceres asociados a infección por VPH, como los cánceres de cavidad oral, esófago, laringe y pulmón, sugieren la posibilidad de la transmisión sexual, **incluyendo la transmisión por vía aérea durante las prácticas de sexo oral**, ya que varios estudios han detectado secuencias idénticas de la región L1 y E6 de VPH 16 y 18 en carcinomas bronquiales y en células sanguíneas. Adicionalmente pacientes femeninos con cáncer cervicouterino muestran una correlación entre frecuencias de detección de VPH 16 y 18 en carcinomas bronquiales y frotis cervicales (Hennig, 1999; Fei, 2006).

El haber encontrado en este trabajo secuencias de VPHs de alto riesgo en cánceres bronquiales en ambos géneros nos permitirá proponer a las autoridades sanitarias de nuestro estado el que amplíen la cobertura de inmunización contra VPHs de alto riesgo, concretamente contra VPH 16 y 18, no solamente a las adolescentes del género femenino, sino que se incluyan a adolescentes del género masculino – ya que son ellos los portadores del virus- y se amplíe la cobertura de edad incluyendo adultos jóvenes de ambos sexos, rompiendo de esta manera la cadena de transmisión.

9. CONCLUSIONES

En el presente trabajo, detectamos secuencias génicas de VPH 16/18 - en muestras de cáncer broncogénico obtenidas de pacientes mexicanos-, mediante PCR y ISH. Encontrando la más alta prevalencia de infección por VPH tipo 16 en adenocarcinomas de pulmón, sugiriendo que la infección por VPH puede estar asociada con el desarrollo de cáncer de pulmón.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Adams D, Kaelin G, WG Jr. 1995. Transcriptional control by E2F. *Semin. Cancer Biol.* 6:99-108.
2. Adams JM, Cory S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 281:1322-1326.
3. Aguayo GF, Meneses MM, Corvalán RA, Muñoz SMA, Koriyama Ch, Eizuru Y, Akiba S. 2007. Identification of human papillomavirus 16 (HPV 16) in keratinizing lung carcinoma: a study in Chile. *Brit J Cancer.* 97:85-91.
4. American Cancer Society. 2004. Prevención y factores de riesgo (on-line) http://www.cancer.org/dcroot/esp/content/esp_5_1x_prevención_y_factoresde_riesgo . (Consulta 26 abril 2013).
5. Antinore J, Birrer J, Patel D, Nader L, McCance DJ. 1996. The human papillomavirus type 16, E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factor. *EMBO J;* 15:1950-1960.
6. Austin F, Fraumeni J, Greenwald P, Kalt M, Liu E, Lowy D, Rabson A, VanNevel P. 1998. Closing in on cáncer. *Nat Can Inst NIH;* 98:3-54.
7. Aznar BS. 2001. Intracellular signaling pathways and carcinogénesis. *Rev Oncol;*3; 238-241.
8. Bachmann A, et al. 2002. Disturbance of tumor necrosis factor- α mediated interferón β signaling in cervical carcinoma cells. *J Virol.* 76:280-291
9. Badillo AI, Badillo SC, Villalobos HR, Avalos DE, Herrera ER. 2003. Defective expression of FasL and Bax in human lung cáncer. *Clin Exp Med.* 3:106-112.
10. Barbosa MS, Lowy R, Schiller T. 1989. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol.* 63:1404-1407.
11. Barbosa MS. 1996. The oncogenic role of human papillomavirus proteins. *Crit Rev Onc.* 7:1-18.
12. Berlin GD, Lenfant CJ. 1982. Cells of the lung: biology and clinical implications. *Am Rev Respir Dis.* 8:366-382.
13. Brouchet L, Valmary S, Dahan M, Didier A, Galateau-Salle F, Brousset P, Degano B. 2005. Detection of oncogenic virus genomes and gene products in lung carcinoma. *Br J Cancer.* 92: 743-746.

14. Carbone D, Kratzke R. 1996. RB1 and p53 genes, In: Mitchell J, Johnson D, Turrisi editors. Lung Cancer: Principles and practice. Philadelphia PA: Lippincott-Raven: 107-121.
15. Castillo A, y cols. 2006. Human papillomavirus in lung carcinomas among three Latin American countries. *Oncol Rep.* 15:883-888.
16. Conrad M, Bubb BJ, Schlegel R. 1993. The human papillomavirus type 6 and 16, E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol* 67:6170-6178.
17. Chen FF, Yan JJ, Lai WW, Jin YT, Su IJ. 1998. Epstein-barr virus-associated non-small Cell lung carcinoma: Undifferentiated "Lymphoepithelioma-like" Carcinoma as a Distinct entity with better prognosis. *Cancer.* 82:2334-2342.
18. Cheng Y W, Chiou H L, Sheu G T, Hsieh L L, Chen J T, Chen Ch Y, Su J M, Lee H. 2001. The association of Human Papillomavirus 16/18 infection with lung Cancer among nonsmoking Taiwanese women. *Cancer Research.* 2799- 2803.
19. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. 2004. Clasificación de papillomaviruses. *Vir.* 324:17-27.
20. De Villiers EM. 1999. Human papillomavirus. Introduction. *Semin cancer Biol* 9:377.
21. De la cruz HE, Mohar BA, Lizano SM. 2004. Elementos víricos y celulares que intervienen en el proceso de replicación del virus del papiloma humano. *Rev Oncol* 6:263-271.
22. De Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule Aj, Meijer CJ and Snijders Pj. 1995. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Virol* 76:1057-1062.
23. DiMaio D, Lai C, Mattoon D. 2000. The platelet-derived growth factor b receptor as a target of the bovine papillomavirus E5 protein. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11:283-293.
24. Dyson N, Howley PM, Munger K & Harlow E. 1989. The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 243:934-937.
25. Franco MF, Villalba CJ. 2001. La epidemia de cáncer pulmonar en México. *Rev Inst Nal E Resp.* 14:207-214.

26. Fraser RG, Paré JA. 1979. Malignant neoplasms. In diagnosis of Diseases of the Chest. Fraser RG, Paré JA. WB Saunders Company. Philadelphia. pp. 1002-1075.
27. Fei Y, Yang J, Hsieh W, Wu Jy, Wu T Ch, Goan YG, Lee H, Cheng YW. 2006. Different human papillomavirus 16/18 infection in Chinese non-small cell lung cancer patients living in Wuhan China. *Jpn J Clin Oncol.* 36:274-279.
28. Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotsinas A, Kyroudi A, Rassidakis AN, Ikonomopoulos JA, Barbatis C, Herrington CS, Kittas C. 1999. Human papillomavirus (HPV) is possibly involved in laryngeal but not in lung carcinogenesis. *Human Pathol.* 30:274-283.
29. Gu Z, Matlashewski G. 1995. Effect of human papillomavirus type 16 oncogenes on MAO kinase activity. *J Virol.* 69:8051-8056.
30. Guccione E, Massimi P, Bernat A, Banks L. 2002. Comparative analysis of the intracellular location of the high-and low-risk human papillomavirus oncoproteins. *Virology* 293:20-25.
31. Giuliani L, Favalli C, Syrjänen K, Ciotti M. 2007. Human papillomavirus infection in lung cancer. Detection of E6 and E7 transcripts and review of the literature. *Anticancer Research.* 27:2697-2704.
32. Hanahan D, Weinberg R A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100: 57-70.
33. Hopfi R, Heim K, Christensen N, Zumbach K, Wieland U, Volgger B, Widschwendter A, Haimbuchner S, Müller-Holzner E, Pawlita M, Pfister H, Fritsch P. 2000. Spontaneous regression of CIN and delayed –type hypersensitivity to HPV 16 oncogen E7. *Lancet* 356:1985-1986.
34. Hennig EM, Suo Z, Karlsen F, Holm R, Thoresen S, Nesland JM. 1999. HPV positive bronchopulmonary carcinomas in women with previous high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Acta Oncol.* 38:639-647.
35. IARC. 1995. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. In Papillomavirus. Lyon. IARC.
36. Javier RT, Butel JS. 2008. The history of tumor virology. *Cancer Res* 68:7693-7706.
37. Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
38. Koshiol J, Rotunno M, Gillison ML, Van Doorn LJ, Chaturvedi AK, Tarantini L, Song H, Quint WGV, Struijk L, Goldstein AM, Hildesheim A, Taylor PR,

- Wacholder S, Bertazzi PA, Landi MT and Caporaso NE. 2011. Assessment human of papillomavirus in lung tumor tissue. *J Nat Cancer Inst.* 103:501-507.
39. Rivera RM, Salazar MA. 2002. Cáncer pulmonar: distribución de acuerdo al tipo histológico, estudio de autopsias. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 15:84-89.
 40. Rous FP. 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J Exp Med.* 13: 397- 411.
 41. Rocca S, Sanna MP, Leoni A, Cossu A, Lissia A, Tanda F, Satta MP, Palmieri G. 2008. Presence of jaagsiekte sheep retrovirus in tissue sections from human bronchioloalveolar carcinoma depends on patients' geographical origin. *Hum Pathol.* 39: 303-304.
 42. Rangel LA, Piña SP, Salcedo M. 2006. Variaciones genéticas del gen supresor de tumores P53: relevancia y estrategias de análisis. *Rev Invest Clin* 58: 254-264.
 43. Rösl F, Das BD, Lengert M, Geletneky & zur Hausen. 1999. Antioxidant – induced changes of the AP-1 transcription complex are paralleled by a selective suppression of human papillomavirus transcription. *J Virol.* 71:362-370.
 44. Schneider E, Montenarh M, Wagner P. 1998. Regulation of Cak kinase activity by p53. *Oncogene* 17:2733-2741.
 45. Smotkin D, Prokoph H, Wettstein O. 1989. Oncogenic and no-oncogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J Virol* 63:1441-1447.
 46. Soto U, Das BC, Lengert M, Finzer P, zur Hausen H, Rösl F. 1999. Conversion of HPV 18 positive non-tumorigenic HeLa-fibroblast hybrids to invasive growth involves loss of TNF- α mediated repression of viral transcription and modification of the AP-1 transcription complex. *Oncogene* 18:3187-3198.
 47. Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. 2007. Lung cancer in never Jiménez OF, Sullivan LJ, Velasco VM, Aguilar CD, Molina GJ, Mendoza PN, Mandokij J. 1999. Ciclo celular y sus anormalidades en el cáncer de pulmón. *Rev Inst Nal E Resp.* 12:214-220.
 48. Jemal A, Chu KC, Tarone RE. 2001. Recent trends in lung cáncer. Mortality in the United States. *J Natl Cancer Inst.* 93:277-283.
 49. Jones DL, Alani RM, Münger K. 1997. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple celular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21C1pl-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* 11:2101-2111.

50. Kasai K, Sato Y, Kameya T, Inoue H, Yoshimura H, Kon S, Kikuchi K. 1994. Incidence of latent infection of Epstein-Barr virus in lung cancers- an analysis of erb 1 expression in lung cancers by in situ hybridization. *J Pathol.* 174:257-265.
51. Krammer PH. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.* 407:789-795.
52. Kelly J. 1990. Cytokines of the lung. State of Art. *Am Rev Respir Dis.* 141:765-783.
53. Lim WT, Chuah KL, Leong SS, Tan EH, Toh CK. 2009. Assessment of human papillomavirus and Epstein- Barr virus in lung adenocarcinoma. *Oncol Rep.* 21:971-975.
54. Magnusson PK, Sparen P& Gylenstein UB. 1999. Genetic link to cervical tumors. *Nature.* 400: 29-30.
55. Mantovani F, Lawrence B. 1999. Inhibition of E6 induced degradation of p53 is not sufficient for stabilization of p53 protein in cervical tumour derived cell lines. *Oncogene.* 18:3309-3315.
56. Mantovani F, Banks L. 2001. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene.* 20:7874-7887.
57. Marham AF. 1996. Carcinoma of the lung: warts and all. *Thorax* 51:878-879.
58. Massion PP, Carbone DP. 2003. The molecular basis of lung cancer. Molecular abnormalities and therapeutic implications. *Respi Res.* 4:12.
59. Medina-Morales F, Salazar-Flores M, Garcia-Sancho M, Franco-Marina F. 2002. Epidemiología descriptiva del cáncer pulmonar en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. *Rev Inst Nal Enf Resp. Mex.* 15:149-152.
60. Miyashita T, reed J. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human Bax gen. *Cell.* 80:293-299.
61. Moore TO, Moore AY, Carrasco D, et al. 2001. Human papillomavirus, smoking and cancer. *J Cutan Med Surg.* 5:323-328.
62. Nakahara T, Nishimura A, Tanaka M, et al. 2002. Modulation of the cell division cycle by human papillomavirus type 18 E4. *J Virol.* 76:10914-10920.
63. Narahari A, Roman A. 2000. Ying yang 1 negatively regulates the differentiation-specific E1 promoter of human papillomavirus type 6. *J Virol* 74:5198-5205.

64. Pray R, Laimins L. 1995. Differentiation-dependent expression of E1^{E4} proteins in cell lines maintaining episomes of human papillomavirus type 31b. *Virology* 206:679-685.
65. Reference S F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
66. Salazar MA, Sandoval RA, Armendáriz BJ. 2013. *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud.* McGrawHill. México, D.F.
67. Sun S, Schiller J H, Gazdar A F. 2007. Lung cancer in never smokers- a different Disease. *Nature.* 7: 778-790.
68. Soini Y, Nuorva K, Kamel D, Pollanen R, Vahakangas K, Lehto VP, Pääkkö P. 1996. Presence of human papillomavirus DNA and abnormal p53 protein accumulation in lung carcinoma. *Thorax.* 51:887-93.
69. Syrjänen KJ. 1979. Condylomatous changes in neoplastic bronchial epithelium. Report a case. *Respiration.* 38:299-304.
70. Syrjänen KJ. 2002. HPV infections and lung cancer. *J Clin Pathol.* 55:885-891.
71. Weinberg RA. 1996. How cancer arise. *Sci Am* 275:32-40.
72. Weinert T, Lydall D. 1993. Cell cycle checkpoints genetic instability and cancer. *Cancer Biol;* 4:129-140.
73. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. 1990. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* 248:76-79.
74. Wilkinson D G. 1995. *In situ* hybridization. A practical approach. Chapt 1-3 IRL Press.Oxford University.
75. Yousem SA, Ohori NP, Sonmez Alpan E. 1992. Occurrence of human papillomavirus DNA in primary lung neoplasms. *Cancer* 69:693-697.
76. Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R , Botz JW , Jansen-Dürr P. 1996. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 13: 2323-2330.
77. zur Hausen H. 1989. Papillomavirus in anogenital cancer: a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res.* 49:4677-4681.
78. zur Hausen H. 2002. Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev.* 2:342-350.

79. zur Hausen H. 2009. Papillomaviruses in the causation of human cancers- a brief historical account. *Virology*. 384:260-265.

RESUMEN BIOGRÁFICO

José Isaías Badillo Almaraz

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: INFECCIONES POR PAPILOMAVIRUS HUMANOS (VPH) 16/18
EN PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR EN MEXICO

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Río Grande, Zacatecas el 5 de septiembre de 1956.
Hijo de José Luis Badillo Cortés y Eustolia Almaraz Alanís.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Zacatecas.
Grado obtenido: Médico Cirujano y Partero en 1980.
Egresado de la Especialidad de Neumología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias en 1985.
Egresado de la Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma de Zacatecas en 1999.

Experiencia Profesional: Maestro de Tiempo Completo de la Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Medicina Humana, desde 1976.
Médico Especialista Adscrito al servicio de Urgencias del Hospital General de Zacatecas “Luz González Cosío”, desde 1989.

ANEXOS



SERVICIOS DE SALUD

DEPENDENCIA:	HOSPITAL GENERAL ZACATECAS
SECCION:	DIRECCIÓN
MESA:	DEPTO. ENSEÑANZA E I
No. DE OFICIO:	2892/008
EXPEDIENTE:	E.E.

*Asunto: Comunicado de
aceptación de protocolo*

Guadalupe, Zac., 11 de Marzo 2007

M EN C. ISAIAS BADILLO ALMARAZ
INVESTIGADOR PRINCIPAL DEL PROTOCOLO 03/2008
PRESENTE

Comunico a usted que su protocolo con Folio 03/2008 titulado:
**"Detección del Papilomavirus Humano tipo 16, 18, 31, 33 en pacientes con
Cáncer Broncogénico"** fue evaluado por el Comité de Investigación y Ética de este
Hospital en donde la conclusión final es que su protocolo ha sido **Aprobado** para su
realización.

Comentarios:

Favor de enviar a esta coordinación un reporte parcial de los avances encontrados dentro
de 6 meses a partir de la fecha

Guillermo Osorio Elías
PRESENTE
DR. J. GUILLERMO OSORIO ELIAS
COORDINADOR DE INVESTIGACIÓN DEL
HOSPITAL GENERAL DE ZACATECAS

SERVICIOS DE SALUD


Hospital General
ZACATECAS
DEPARTAMENTO
DE ENSEÑANZA E
INVESTIGACIÓN

ccp. Dr. J. Francisco Maseya Dávila, Director del HGZ y Presidente del Comité de Investigación y Ética
ccp. Dra. Cristina López Dávila, Jefa de Enseñanza e Investigación de HGZ
ccp. archivo

Human Papillomavirus 16/18 Infections in Lung Cancer Patients in Mexico

Isaías Badillo-Almaraz^{a, c} Pablo Zapata-Benavides^a Santiago Saavedra-Alonso^a
Diana Zamora-Avila^b Diana Reséndez-Pérez^a Reyes Tamez-Guerra^a
Rafael Herrera-Esparza^c Cristina Rodríguez-Padilla^a

^aUniversidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología e Inmunología, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, ^bUANL, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Genética, Campus de Ciencias Agropecuarias, Escobedo, and ^cUniversidad Autónoma de Zacatecas (UAZ), Facultad de Medicina Humana, Ciudad Universitaria, Hospital General 'Luz González Cosío', and Centro de Biología Experimental, UAZ, Guadalupe, Mexico

Key Words

Human papillomavirus · Lung cancer · Mexico

Abstract

Background/Aims: Human papillomavirus (HPV) is an epitheliotropic, double-stranded DNA virus, and its high-risk genotypes are associated with human cancer. HPV genome has been detected in lung carcinomas in certain places around the world, including Mexico; however, the prevalence of this is unclear. In this study, we examine the frequency of high-risk HPV 16/18 in lung cancer tissues from a Mexican population. **Methods:** 39 lung cancer specimens were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) using HPV GP5+/GP6+ primers and then were genotyped using specific primers to HPV 16/18. Additionally, in situ hybridization (ISH) was performed using BIO-labeled oligonucleotide probes. **Results:** Our results identified 15 positive cases (38.46%) for HPV 16 and 1 positive case (2.56%) for HPV 18 by PCR. ISH showed the presence of HPV DNA in 13 of 16 (81%) samples, in agreement with the PCR results. **Conclusions:** In this study, we detected HPV 16/18 gene sequences in lung cancer samples obtained from Mexican patients by PCR and ISH. We found the highest prevalence of HPV 16

infection in lung adenocarcinomas, suggesting that HPV infection may be associated with lung cancer. However, further studies are needed to elucidate the role of HPV in lung carcinogenesis.

Copyright © 2013 S. Karger AG, Basel

Introduction

Lung cancer is the second most prevalent malignant tumor among both men and women and is the leading cause of cancer deaths in Mexico. In addition, the death rate due to lung cancer is increasing [1, 2]. Cigarette smoking is considered to be the most important risk factor. However, it is conceivable that environmental factors are associated with lung carcinogenesis, such as diesel fumes, wood smoke, silica, asbestos, arsenic, and residential radon exposure [3, 4]. Recently, a viral etiology of lung cancer has been proposed [5]. Several viral nucleic acid sequences have been detected in lung pathologies, including those of the Epstein-Barr virus in squamous cell carcinoma (SQC) and adenocarcinoma of the lung [6, 7], those of zoonotic viruses such as Jaagsiekte sheep retrovirus in sheep breeders who develop lung cancer [8], and recently those of human papillomavirus (HPV) in lung cancer [9–15].

© S. Karger AG, Basel

**PROOF Copy
for personal
use only**

ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT.

HPV infection may be related to pulmonary tumorigenesis; etiological involvement of high-risk HPV in the development of lung cancer was originally postulated by Syrjänen [9] and confirmed in other studies that most frequently detected the HPV 16/18 genotypes. HPV infection is more frequently associated with non-smoking lung cancer patients [12, 13].

In a recent meta-analysis, 100 studies of the literature reporting HPV detection in lung cancer were evaluated, covering 7,381 lung cancer cases analyzed for HPV from different geographical regions. Altogether, 1,653 (22.4%) samples tested HPV-positive [16].

HPV is an epitheliotropic virus, and it is possible that high-risk types (HPV 16 and 18) contribute to lung cancer as co-carcinogens. Several studies implicating HPV in bronchial carcinogenesis have found an identical pattern to that observed in squamous cell tumors currently classified as emerging HPV lesions, for example those of the oral cavity, esophagus, larynx, and conjunctiva [10].

Studies of the prevalence of HPV infection in lung cancer have reported incidences of 69% in Finland, 78% in Norway, 55% in Taiwan, 22% in Italy, and 5% in India 5%. However, a study performed in Greece did not support a role of HPV in lung carcinogenesis [9, 11–14]. In Latin America, the presence of the HPV genome in lung cancer tissues has been reported at 29% in Chile, 8% in Peru, and 33% in Mexico [15]. This work strengthens the few studies conducted in Latin America.

Here, we search for high-risk HPV 16/18 gene sequences in lung cancer tissues from a Mexican population.

Material and Methods

Sample Collection

A total of 39 non-small cell lung cancer specimens were examined, 14 from female patients and 25 from male patients. The average age of these patients was 55 years. 20 samples were collected of several lung pathologies, such as samples of thoracic surgery, bronchoscopic biopsy, and bronchoalveolar lavage and pleural biopsy. All samples were obtained from the Hospital Regional de Zacatecas in Mexico City during the period from 2006 to 2009. Requests of the resected tissue specimens were under consent by patients, approved by the internal ethics committee, and carried out in accordance with the Helsinki Declaration. SiHa and HeLa cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, Va., USA) and cultured and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEMF-12; Life Technologies, Carlsbad, Calif., USA) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, and 100 g/ml streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA). Cell lines were incubated in a humidified chamber at 37° in a 95% O₂ and 5% CO₂ atmosphere and were used as positive controls.

Detection of HPV Sequences by Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA was extracted from tissue samples and cell lines using DNAzol genomic DNA isolation reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, Ohio, USA) following the manufacturer's instructions. The DNA concentration was determined by measuring the 260/280 nm absorbance of each sample with a Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 (Milton Keynes, UK).

DNA quality was assessed by amplifying a 192-bp fragment of the β -globin gene using a set of PCO3/PCO4 primers: 5'-ACA-CAACTGTGTTCACTAGC-3' and 5'-CAACTTCATCCACGTT CACC-3', respectively [14].

HPV DNA was detected using GP5+/GP6+ primers (forward primer 5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3' and reverse primer 5'-GAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3') to amplify a 150-bp fragment of L1 gene using the following specifications: 94° for 2 min, 40 cycles of 94° for 45 s, 66° for 5 s, 71° for 1.5 min, and a final extension of 10 min at 72° [17].

To confirm the detection of HPV types 16 and 18, a PCR amplification was performed using primers specific to either HPV 16 or HPV 18 to amplify 227- and 194-bp products, respectively (16 VPH up 5'-TACTAACTTTAAGGAGTACC-3' 16 VPH dn 5'-GTGTATGTTTTTGACAAGCAATT-3' and VPH 18 up 5'-CC AAATTTAAGCAGTATAGC-3' VPH 18 dn 5'-TTGTACAAAA CGATATGTATCCA-3'). The amplification was performed using the following specifications: 94° for 4 min, 35 cycles of 94° for 30 s, 50° for 50 s, 72° for 40 s, and 72° for 5 min [13].

PCR products were separated by electrophoresis on 1.2% agarose gels, and the products were visualized with ethidium bromide and photographed under ultraviolet light.

The purified PCR products were submitted for automated DNA sequencing and analyzed with an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. The sequences were compared with HPV genomes submitted to the National Center for Biotechnology Information (NCBI)-GenBank using the BLAST program (NCBI) [18].

In situ Hybridization (ISH)

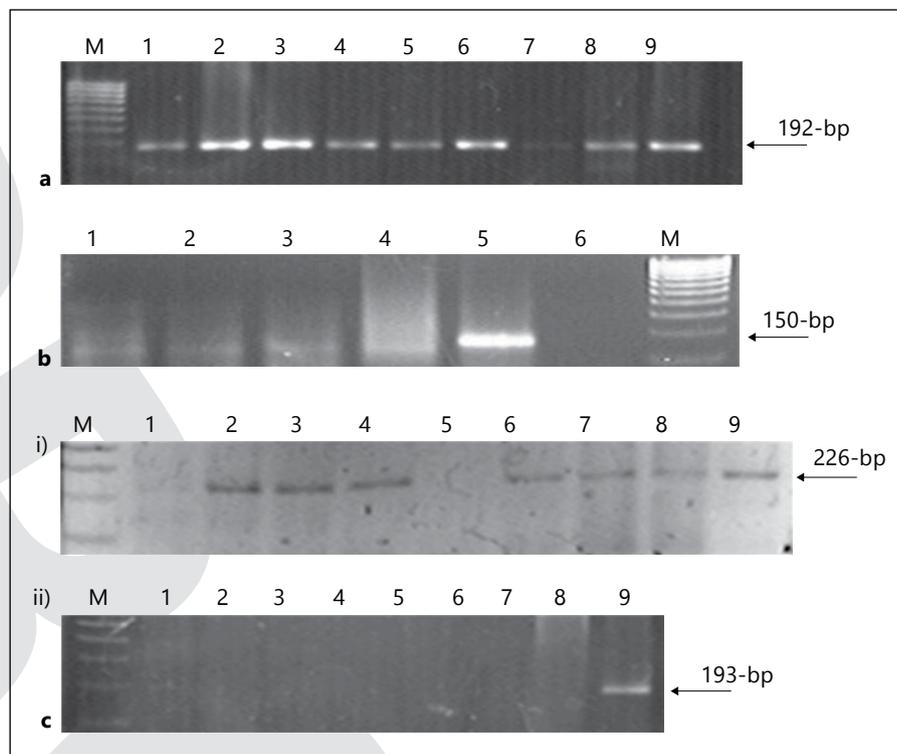
ISH to detect HPV types 16 and 18 DNA was performed using BIO-labeled oligonucleotide probes (Pan Path, Amsterdam, the Netherlands) following the manufacturer's instructions. Briefly, deparaffinized and rehydrated 4- μ m sections were subjected to digestion with pepsin, rinsed with phosphate-buffered saline, and dehydrated. Denaturation and hybridization procedures were performed by applying 1 drop of probe solution to each specimen, incubating slides in a humidified chamber at 95° for 5 min and in a moist environment for 16 h at 37°, and washing with Tris-buffered saline buffer. Detection was performed by applying a horseradish peroxidase-conjugated antidigoxigenin antibody and 2 drops of AEC work solution. The slides were then incubated in the dark to allow the signals to develop. Methyl green was used as a counterstain [19].

Results

Presence of HPV 16 and 18 Sequences in DNA Isolated from Lung Samples

First, to verify the quality of isolated DNA, PCR was done to amplify the β -globin gene. All 39 samples

Fig. 1. PCR amplifications of HPV in lung samples. **a** PCR for β -globin gene in lung samples. PCR control to amplify a 192-bp product to analyze DNA integrity. M: 100-bp molecular weight marker. Lanes 1–9: lung samples. **b** PCR amplification of HPV L1 gene sequences in lung samples. Agarose gel electrophoresis of PCR products from the GP5+/GP6+ primer set to amplify a 150-bp product. Lane 1: SQC, lanes 2 and 3 are ACs, lane 4: SQC, lane 5: SiHa cell line as positive control, lane 6: negative control, and lane M: 100-bp molecular weight marker. **c** PCR amplification with HPV 16/18 type-specific primers in lung samples. DNA was re-amplified using the HPV 16/18 type-specific primers. Representative images of lanes positive and negative for (i) HPV 16 (226-bp product) and (ii) HPV 18 (193-bp product). M: 100-bp molecular weight marker. Lanes 1–9: lung samples.



showed the expected amplification of a 192-bp product (fig. 1a).

As a first step in the detection of HPV sequences, PCR screening using the general HPV-specific GP5/GP6 primers was performed, which led to the detection of the expected 150-bp product in 16 samples (41%; fig. 1b). Of these HPV-positive cases, 56% (9 cases) were from male patients and 44% (7 cases) were from female patients.

These 16 positive samples were analyzed in a second round of PCR using primers specific for HPV 16 and HPV 18 to amplify products of 226 and 193 bp, respectively (fig. 1c, i and ii). Of the 16 samples, 93.75% (15 samples) as well as the SiHa cell line positive control were found to be positive for HPV 16 sequences, and 6.25% (1 sample) as well as the HeLa cell line positive control were found to be positive for HPV 18 sequences.

Two HPV 16 PCR products and one HPV 18 PCR product were sequenced to confirm their identity in the GenBank. The two sequences corresponding to HPV 16 had 100% homology with the HM596523 sequence, and the only positive HPV 18 sample had 100% homology with the GQ180792 sequence (fig. 2a, b).

With respect to histopathology, HPV was detected in 10 out of 18 (55.5%) adenocarcinomas (ACs) and 6 out of

21 (28.5%) SQCs (table 1). HPV 16 was the most frequent HPV type in both ACs and SQCs, and only 1 patient with SQC was positive for HPV 18 (fig. 3a, b).

Presence of HPV DNA in Lung Cancer Samples Confirmed by ISH

ISH was performed to confirm the presence of HPV sequences in cancer cells and not in normal cells. The results revealed that 13 lung cancer samples were positive for ISH from the 16 samples that were PCR-positive for HPV 16/18 sequences. The distribution of ISH-positive signals revealed that HPV DNA was limited only to the malignant cells and was not observed in adjacent normal cells (fig. 3a, b).

Discussion

Multiple risk factors have been associated with lung cancer development. Although the main risk factor is smoking, other factors that may influence the development of lung cancer, such as environmental pollution and genetic factors, have been reported [3]. However, not all smokers will develop bronchial cancer in their lifetime, and, in addition, these tumors do occur in patients who have never

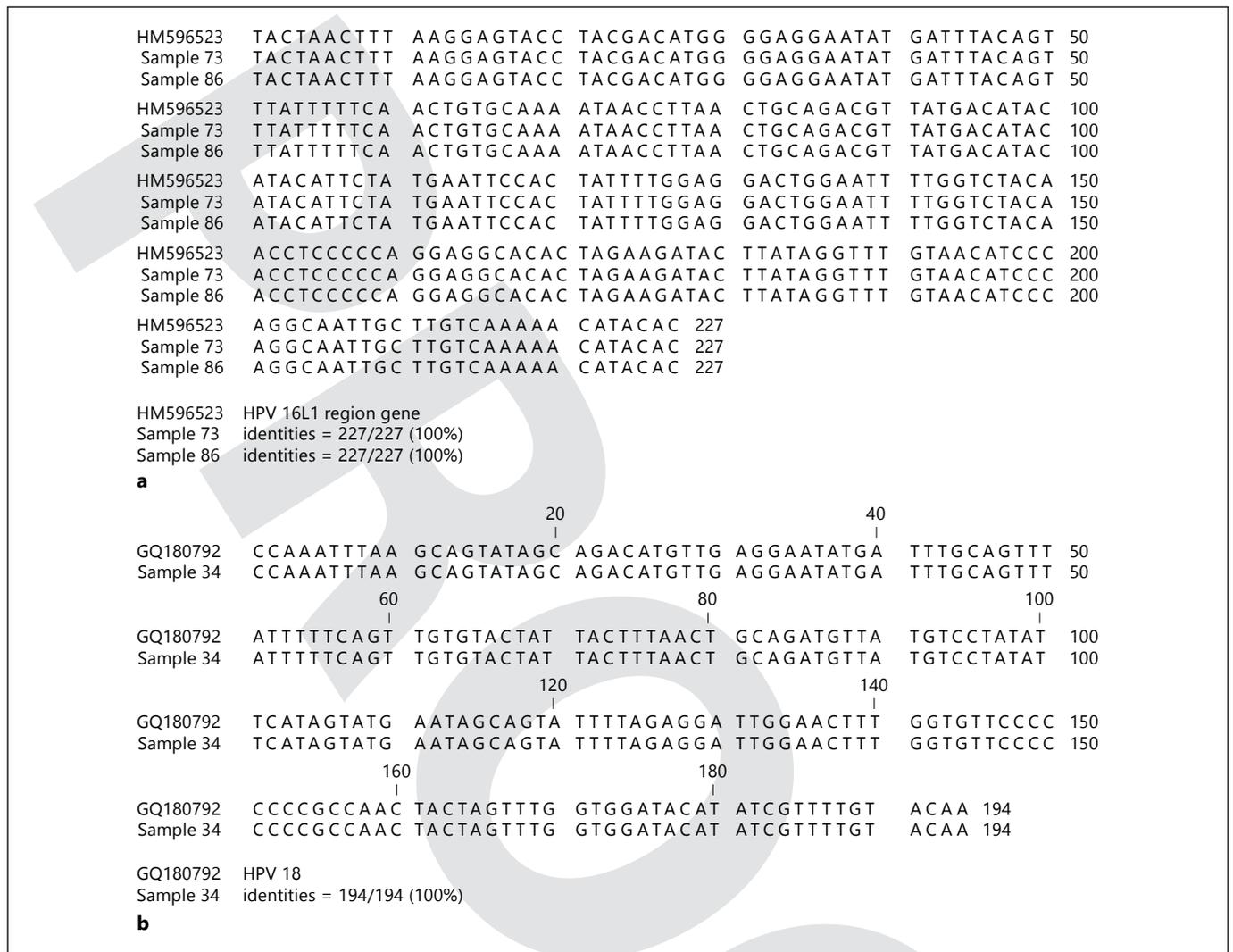


Fig. 2. HPV 16/18 gene sequencing. Comparison of HPV 16/18 gene sequences amplified from lung samples. HPV 16 sequences were compared with the reported sequence of HM596523, and HPV 18 sequences were compared with GQ180792.

smoked [4]. Interestingly, bronchial carcinomas have also been described in children [10]. The possible involvement of high-risk HPV in bronchial squamous cell lesions was first suggested in 1977 by Syrjänen [9]. Since that time, several studies have confirmed the detection and expression of HPV oncogenes in non-small cell lung cancer [20], although the detection rate in ACs of the lung is much lower [12–15] and many studies failed to demonstrate the presence of HPV DNA [11].

Syrjänen [16, 21, 22] performed a systematic review and meta-analysis of the literature reporting on HPV detection in lung cancer and reported that the HPV prevalence was 22.4%, which is practically similar as in all other HPV-associated lesions in the respiratory and upper gastro-

intestinal tract. In addition, HPV is an epitheliotropic double-stranded DNA virus, and experimental data accumulated so far suggest that similar mechanisms as those detected in HPV-associated cervical carcinogenesis might also be involved in bronchial carcinogenesis [9, 10, 23].

Since that time, several studies have confirmed the presence of HPV DNA in lung cancer, although the detection rate in ACs of the lung is much lower [12–15] and many studies failed to demonstrate the presence of HPV DNA [11]. For these reasons, we hypothesize that the involvement of high-risk HPV 16/18 may not be restricted to carcinomas of the uterine cervix but rather may be associated with lung cancer in the Mexican population. The high number of HPV-positive cases in lung

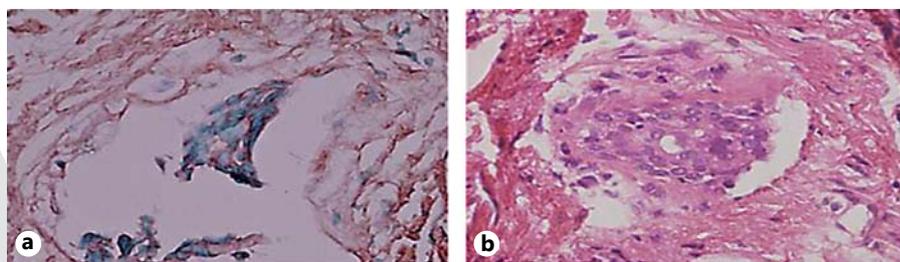


Fig. 3. ISH of HPV 16/18 DNA. **a** Representative positive signals of HPV 18 DNA by ISH in paraffin sections of SQC. ISH-positive signals in lung tumors are limited to the malignant cells and not observed in adjacent normal cells. Section of squamous cell lung

counterstained with methyl green. $\times 200$. **b** Representative positive signals of HPV 16 DNA by ISH in paraffin sections of AC. Strong HPV 16 DNA signal in a section of lung AC that is not counterstained. $\times 200$.

Table 1. Clinicopathological features of lung SQCs and ACs

	SQC, n (%)	AC, n (%)	p value ¹
Total ²	21 (100)	18 (100)	
Gender			
Male	16 (76)	9 (50)	0.1083
Female	5 (24)	9 (50)	
Smoking			
Smoker	15 (71)	12 (67)	1.0
Non-smoker	6 (29)	6 (33)	
HPV genotype			
HPV 16	5 (24)	10 (56)	0.375
HPV 18	1 (5)	0 (0)	
ISH			
ISH+	6 (29)	7 (39)	0.5196
ISH-	15 (71)	11 (61)	

¹ p values reflecting differences between SQCs and ACs were obtained from Fisher's exact test.

² Total number and percent of patients with each histological type.

cancer may reflect the high rate of prevalence of HPV in cervical cancer [24].

HPV may infect both the epithelial respiratory tract and uterine cervix because the preferred sites of entry are the metaplastic squamous cells where HPV interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans and integrins [4, 5] of the squamo-columnar junctions (SCJs) [25]. The presence of SCJs at multiple locations in the respiratory tract is considered to be a prerequisite for the spread of HPV bronchial infections. The most important cause of SCJ formation in the bronchi is cigarette smoking, which frequently triggers the development of squamous metaplasia [9]. Thus, the situation in the bronchi with multiple foci of metaplastic squamous epithelium is reminiscent of that in the transformation zone of the uterine

cervix, and these figures are similar to those seen in squamous cell malignancies of the airway [9, 23].

HPV pathogenesis involves molecular alterations caused by oncoproteins, such as E6 and E7, which facilitate cellular transformation and immortalization. The HPV E6 oncoprotein interacts with the p53 tumor suppressor protein and induces accelerated proteasomal degradation of p53 via a host cell ubiquitin ligase [26]. The E6 oncoprotein also increases cellular telomerase activity, predominantly by inducing transcription of the hTERT gene. The hTERT protein is the catalytic subunit of the telomerase enzyme complex involved in the rate-limiting step and is selectively expressed in a small subset of normal cells (stem cells), tumor tissues, and tumor-derived cell lines [23]. E7 inhibits pRb, which releases E2F and results in the upregulation of INK4A (also known as p16). In addition, E7 seems to stimulate cyclins A and E and inactivate the cyclin-dependent kinase inhibitors WAF1 (also known as p21) and KIP1 (also known as p27). In this way, E6 and E7 synergize in cell immortalization and malignant transformation: E6 prevents apoptosis that is induced by high E2F levels and E7 rescues E6 from inhibition by INK4A [14, 15, 23, 26].

The transmission route of HPV detected in lung carcinomas is as yet unclear, although studies on HPV infection and cancers of the oral cavity, esophagus, and lung suggested the possibility of sexual transmission. Recent studies detected identical L1 and E6 HPV 16/18 sequences in lung carcinomas and blood cells. In addition, female cancer patients showed a correlation between HPV 16/18 detection frequencies in lung carcinomas and cervical smears [14, 15].

Our results are not in accordance with all previous studies conducted in other countries [5, 12–15]. In Mexico, there has been only one other study reporting the presence of HPV DNA in lung carcinomas, which found

a frequency of 5 HPV-positive samples out of 15 (33%) [15]. However, the reported variability in HPV detection rates in lung cancer is better explained by geographical study origin and histological types of cancer than by the HPV detection method itself [16].

However, the frequency of HPV-positive samples reported in this study is substantially higher, and HPV sequences were much more frequently found in ACs than in SQCs, similar to findings in northern Europe, Finland, and Norway [27, 28]. In addition, we observed that HPV was slightly more commonly found in the lung samples of males than those of females. These observations suggest the presence of demographic and geographic differences in HPV-related lung carcinogenesis.

References

- 1 Franco-Marina F, Villalba-Caloca J: La epidemia de cáncer pulmonar en México. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2001;14:207–214.
- 2 Medina-Morales F, Salazar-Flores M, Garcia-Sancho M, Franco-Marina F: Epidemiología descriptiva del cáncer pulmonar en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2002;15:149–152.
- 3 Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57–70.
- 4 Sun S, Schiller JH, Gazdar AF: Lung cancer in never smokers – a different disease. *Nature* 2007;7:778–790.
- 5 Brouchet L, Valmary S, Dahan M, Didier A, Galateau-Salle F, Brousset P, Degano B: Detection of oncogenic virus genomes and gene products in lung carcinoma. *Br J Cancer* 2005;92:743–746.
- 6 Kasai K, Sato Y, Kameya T, Inoue H, Yoshimura H, Kon S, Kikuchi K: Incidence of latent infection of Epstein-Barr virus in lung cancers – an analysis of EBEB1 expression in lung cancers by in situ hybridization. *J Pathol* 1994;174:257–265.
- 7 Chen FF, Yan JJ, Lai WW, Jin YT, Su IJ: Epstein-Barr virus-associated non-small cell lung carcinoma: undifferentiated ‘lymphoepithelioma-like’ carcinoma as a distinct entity with better prognosis. *Cancer* 1998;82:2334–2342.
- 8 Rocca S, Sanna MP, Leoni A, Cossu A, Lissia A, Tanda F, Satta MP, Palmieri GP: Presence of jaagsiekte sheep retrovirus in tissue sections from human bronchioloalveolar carcinoma depends on patients’ geographical origin. *Hum Pathol* 2008;39:303–304.
- 9 Syrjänen KJ: HPV infections and lung cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:885–891.
- 10 Zur Hausen H: Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology* 2009;384:260–265.
- 11 Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotsinas A, Kyrouti A, Rassidakis AN, Ikonomopoulos JA, Barbatis C, Herrington CS, Kittas C: Human papilloma virus is possibly involved in laryngeal but not in lung carcinogenesis. *Hum Pathol* 1999;30:274–283.
- 12 Cheng YW, Chiou HL, Sheu GT, Hsieh LL, Chen JT, Chen CY, Su JM, Lee H: The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. *Cancer Res* 2001;61:2799–2803.
- 13 Fei Y, Yang J, Hsieh WC, Wu JY, Wu T, Goan YG, Lee H, Cheng YW: Different human papillomavirus 16/18 infection in Chinese non-small cell lung cancer patients living in Wuhan China. *Jpn J Clin Oncol* 2006;36:274–279.
- 14 Aguayo F, Castillo A, Koriyama C, Higashi M, Itoh T, Capetillo M, Shuyama K, Corvalan A, Eizuru Y, Akiba S: Human papillomavirus 16 is integrated in lung carcinomas: a study in Chile. *Br J Cancer* 2007;97:85–91.
- 15 Castillo A, Aguayo F, Koriyama C, Shuyama K, Akiba S, Herrera GR, Carrascal E, Klinge G, Sanchez J, Eizuru Y: Human papillomavirus in lung carcinomas among three Latin American countries. *Oncol Rep* 2006;15:883–888.
- 16 Syrjänen K: Detection of human papillomavirus in lung cancer: systematic review and meta-analysis. *Anticancer Res* 2012;32:3235–3250.
- 17 De Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ: The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3’ ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995;76:1057–1062.
- 18 Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: ‘Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs’. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389–3402.
- 19 Wilkinson DG: *In situ Hybridization: A Practical Approach*. Oxford, IRL Press, 1995.
- 20 Ciotti M, Giuliani L, Ambrogi V, Ronci C, Benedetto A, Mineo TC, Syrjänen K, Favalli C: Detection and expression of human papillomavirus oncogenes in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2006;16:183–189.
- 21 Syrjänen K, Syrjänen S: Detection of human papillomavirus in sinonasal carcinoma: systematic review and meta-analysis. *Hum Pathol* 2012 (E-pub ahead of print).
- 22 Syrjänen K, Syrjänen S: Detection of human papillomavirus in esophageal papillomas: systematic review and meta-analysis. *APMIS* 2013;121:363–374.
- 23 Zur Hausen H: Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature* 2002;2:342–350.
- 24 Juárez-Figueroa LA, Wheeler CM, Uribe-Salas FJ, Conde-Glez CJ, Zampilpa-Mejía LG, García-Cisneros S, Hernández-Avila M: Human papillomavirus: a highly prevalent sexually transmitted disease agent among female sex workers from Mexico City. *Sex Transm Dis* 2001;28:125–130.
- 25 De la Cruz E, Mohar A, Lizano M: Elementos viricos y celulares que intervienen en el proceso de replicación del virus del papiloma humano. *Rev Oncol* 2004;6:263–271.
- 26 Barbosa MS: The oncogenic role of human papillomavirus proteins. *Crit Rev Oncog* 1996;7:1–18.
- 27 Soini Y, Nuorva K, Kamel D, Pöllänen R, Vähäkangas K, Lehto VP, Pääkkö P: Presence of human papillomavirus DNA and abnormal p53 protein accumulation in lung carcinoma. *Thorax* 1996;51:887–893.
- 28 Hennig EM, Suo Z, Karlson F, Holm R, Thoresen S, Nesland JM: HPV-positive bronchopulmonary carcinomas in women with previous high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Acta Oncol* 1999;38:639–647.