Rev Venez Oncol 2015;27(2):66-71

VIRUS HERPES SIMPLE EN MUESTRAS DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO POSITIVAS PARA VPH

ZORAYA DE GUGLIELMO, DAYAHINDARA VEITÍA, MAIRA ÁVILA, ANDREÍNA FERNANDES, JUAN F LIUZZI, MARÍA CORRENTI, SAÚL SISO, MARIBEL DA CUNHA

INSTITUTO DE ONCOLOGÍA Y HEMATOLOGÍA-MPPS, HOSPITAL ONCOLÓGICO PADRE MACHADO, CARACAS, VENEZUELA

RESUMEN

OBJETIVO: El virus de papiloma humano es el agente etiológico del cáncer de cuello uterino y también se ha relacionado como factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de cabeza y cuello; este tipo de cáncer también se ha asociado con virus Epstein Barr y con virus herpes simple. Con este último, los resultados son controversiales, especialmente en estudios basados en biología molecular. La evidencia más fuerte que sugiere al virus herpes simple como factor o cofactor de riesgo en cáncer de cabeza y cuello se ha obtenido en estudios serológicos. **MÉTODO**: En el presente estudio se evaluó la presencia, mediante PCR, del VHS 1 y VHS 2 en 45 muestras de cáncer de cabeza y cuello que previamente resultaron positivas en la detección de VPH. **RESULTADOS**: Se obtuvo un 37,7 % y 26,6 % de positividad para VHS 1 y VHS 2, respectivamente. **CONCLUSIONES**: Aunque no se encontró relación entre la infección por este virus con otros factores de riesgo en cuanto a características particulares de la patología, su presencia en alto porcentaje de las muestras apoya los resultados registrados en otros estudios moleculares y serológicos que sugieren al virus herpes simple como factor o cofactor de riesgo de esta malignidad.

PALABRAS CLAVE: Cáncer, cabeza, cuello, VHS, PCR.

SUMMARY

OBJECTIVE: The human papilloma virus is the etiologic agent of the cervical cancer and has been linked as a risk factor in the development of the head and neck cancer. This malignancy has also been associated with Epstein Barr virus and the herpes simplex virus. With the herpes simplex virus, the results are controversial, especially in the studies based on molecular biology. The strongest evidence suggesting that herpes simplex virus as a risk factor or cofactor in the development of head and neck cancer and was obtained in the serological studies. **METHOD**: This study evaluated the presence, by PCR, of HSV 1 and HSV 2 in 45 samples of head and neck cancer who previously tested positive for the detection of HPV. **RESULTS**: We obtained 37.7 % and 26.6 % of the samples were positive for HSV 1 and HSV 2, respectively. **CONCLUSION**: Although no relationship was found between the infection with this virus and the other risk factors in terms of characteristics of the disease, its presence in a high percentage of the samples support the results reported in other molecular and serological studies, which suggest the herpes simplex virus as a risk factor or cofactor in the development of this malignancy.

KEY WORDS: Cancer, head, neck, HSV, PCR

Recibido: 13/07/2014 Revisado: 15/11/2014
Aceptado para publicación: 18/12/2014

Correspondencia: Dra. Zoraya de Gugliemo. Instituto de Oncología y Hematología (MPPS), Caracas, Venezuela.
E-mail: zdegugli@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Desde hace varios años se ha estudiado el papel de virus y bacterias en el desarrollo de procesos cancerígenos. En general, los virus pueden favorecer la carcinogénesis al inducir inmunosupresión o modificar el genoma de la célula huésped y el patrón de expresión de proteínas y/o micro ARNs (miARN) involucrados en mecanismos de reparación del ADN, regulación del ciclo celular y apoptosis [1,2].

Actualmente es bien conocida la actuación del virus de papiloma humano (VPH) como agente etiológico del cáncer de cuello uterino y también se le ha relacionado como factor de riesgo en el desarrollo de carcinomas epidermoide de cabeza y cuello [3,4]. Por su parte, Veitía y col., en un trabajo con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello detectaron este virus en el 40 % de las muestras evaluadas, siendo el tipo 11 (de bajo riesgo oncogénico) el más frecuente, correspondiendo al 58 % de los casos positivos [5].

El cáncer de cabeza y cuello (CCC), especialmente carcinoma nasofaríngeo, carcinoma epidermoide de amígdala y carcinoma supraglótico, también se ha asociado con el virus Epstein Barr [2,6] y con el virus herpes simple (VHS). Con este último, los resultados son controversiales, principalmente en aquellos estudios donde se ha detectado el virus mediante biología molecular [7]. La evidencia más fuerte que sugiere al VHS como factor o cofactor de riesgo en el CCC se ha obtenido en estudios serológicos, en los cuales se ha reportado un mayor riesgo para el desarrollo de este cáncer en pacientes con los títulos más altos de anticuerpos anti IgG contra VHS [2,8]. Incluso, se han evaluado los niveles de anticuerpo contra un péptido mutagénico del VHS en pacientes con CCC, resaltando el papel de este péptido en la carcinogénesis [9].

Los mecanismos mediante los cuales este virus de ADN de doble cadena pudiera inducir o favorecer el desarrollo de malignidad no están totalmente claros. Sin embargo, la persistencia del virus en la cavidad oral y su capacidad de modificar la síntesis y reparación del ADN del hospedador durante reactivaciones de la infección sugiere que puede contribuir al desarrollo de carcinogénesis [2].

En el presente estudio se evaluó la presencia, mediante PCR, del VHS 1 y el VHS 2 en muestras de CCC que previamente resultaron positivas en la detección de VPH.

MÉTODO

Material biológico: las muestras en estudio correspondieron a 45 ADNs de biopsias de pacientes con CCC que previamente fueron evaluadas para la detección y tipificación de VPH, resultando positivas para este virus [5]. Las biopsias provenían de tumores en distintas localizaciones anatómicas que incluían orofaringe, laringe, cavidad oral, seno paranasal, amígdala y fosa nasal. El 100 % de los pacientes presentaba hábitos tabáquicos y/o de alcohol.

Detección del VHS: para la detección de secuencias genómicas del VHS1 y el VHS2 se utilizaron los *kits* comerciales *"HSV type 1 DNA pol Primer Set Kit" y "HSV type II DNA polymerase Primer Set Kit" de Maxim Biotech®*, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. En ambos procedimientos se obtiene un producto de 101 pb para los casos positivos. Los productos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, *buffer* TBE 1X, tinción con bromuro de etidio, y registrados mediante *ChemiDoc XRS+ (BIORAD)®*.

Pruebas estadísticas: se aplicó el test exacto de Fisher con un intervalo de confianza del 95 % para evaluar la asociación entre el grado y el estadio del tumor, la progresión de la enfermedad,

consumo de alcohol, exposición al tabaco, sobrevida, edad, género, localización y número de tumores con la presencia de VHS.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 1. Se observa que 17/45 muestras (37,7 %) fueron positivas para VHS1 y 12/45 muestras (26,6 %) resultaron positivas para VHS2; 5 muestras (11,1 %) presentaron secuencias de ambos tipos virales.

La Figura 1 corresponde a los resultados de la electroforesis en gel de agarosa para VHS1, donde se observa la banda esperada de 101 pb en un grupo de muestras positivas y en el control positivo presente en el *kit*. Este producto no se observó en el control negativo (realizado con agua destilada y mezcla de reacción). Igualmente, para el VHS 2 se obtuvo la banda esperada de 101 pb (Figura 2). Cabe mencionar que aunque los productos de amplificación para ambos tipos de VHS tenían el mismo tamaño, los primeros usados en cada caso presentan secuencias diferentes, tal como lo señala el fabricante de los *kits*.

En cuanto a la relación entre la presencia del VHS con la ubicación, el grado y el estadio del tumor, número de tumores, la progresión de la enfermedad, consumo de alcohol, exposición al tabaco, sobrevida, edad y género no se encontró asociación significativa, P> 0,05 (datos no mostrados).

Cuadro 1. Resultados de la detección de VHS1 y 2 en las muestras en estudio

Detección VHS 1		Detección de VHS 2	
Nº muestras positivas	Nº muestras negativas	Nº muestras positivas	Nº muestras negativas
17/45 (37,7 %)	28/45 (62,2 %)	12/45 (26,6 %)	33/45 (73,3 %)

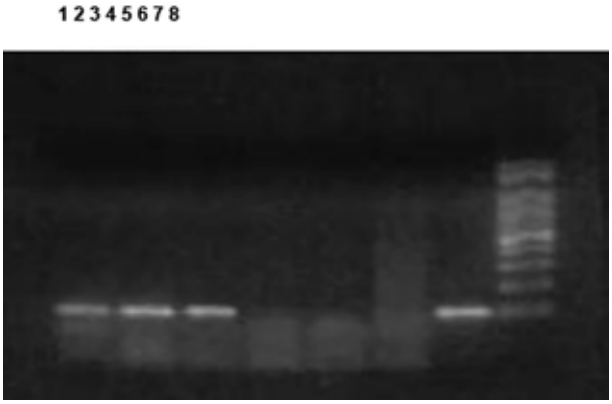

Figura 1. Detección del virus herpes 1 mediante PCR. **1-5:** Muestras en estudio. **6:** Control negativo. **7:** Control positivo. **8:** Marcador de peso molecular (100 pb). Los carriles 1, 2 y 3 corresponden a muestras positivas donde se observa la banda de aproximadamente 100 pb, al igual que en el control positivo (carril 7). Los carriles 4 y 5 corresponden a muestras negativas.

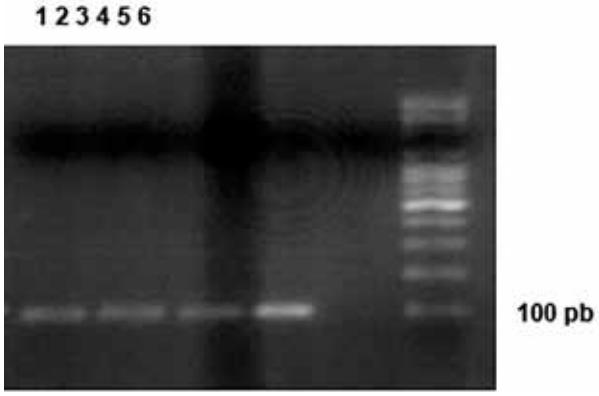

Figura 2. Detección del virus herpes 2 mediante PCR. **1-3:** Muestras en estudio que resultaron positivas; **4:** Control positivo donde se observa la banda de 101 pb; **5:** Control negativo; **6:** Marcador de peso molecular (100 pb).

DISCUSIÓN

El CCC de células escamosas es el sexto cáncer más común en el mundo, presentándose en distintos sitios del tracto aerodigestivo superior [1]. Se ha establecido que los principales factores de riesgo para el desarrollo de este cáncer son el alcohol y el tabaco, los cuales pueden actuar independiente o sinérgicamente. En cuanto a su asociación con microorganismos, se considera la infección por VPH como un factor de riesgo independiente y se ha sugerido la posible actuación de otros virus (Epstein Barr y VHS), como cofactores de la infección por VPH o factores independientes [10].

Dada la frecuencia de ocurrencia de esta malignidad alrededor del mundo, es importante avanzar en los conocimientos sobre la etiología y las bases moleculares que contribuyan con el diagnóstico temprano y preciso, así como con la prevención y establecimiento de tratamientos más efectivos.

Son pocos los trabajos sobre detección de VHS en CCC mediante métodos moleculares, reportándose resultados positivos en algunos casos y negativos en otros, lo que ha llevado a controversias en cuanto al posible papel como factor o cofactor de riesgo del virus en el desarrollo y/o progresión de esta malignidad. Sin embargo, ha sido destacada la influencia del VHS especialmente en el carcinoma de células escamosas de orofaringe, en combinación con otros factores de riesgo tanto físicos (tabaco y alcohol) como biológicos (VPH). Así, algunos estudios se han basado en el potencial mutagénico del VHS, a partir del cual este virus pudiera modificar el ADN de la célula hospedadora y/o potenciar el efecto del VPH y de carcinógenos químicos en el surgimiento y progresión del cáncer [11,12].

Los mecanismos propuestos sugieren sinergia entre el VHS y nitrosaminas presentes en el tabaco, de manera que la exposición a dichos compuestos químicos previamente a la infección viral incrementa el riesgo de desarrollar CCC [13]. Además, la coinfección con el VHS pudiera actuar sobre la forma episomal del VPH e inducir su integración dentro de la célula huésped, como sugirieron los autores de un estudio en el que se evaluaron pacientes con papilomatosis laríngea y se observó una evolución más agresiva de la malignidad en los casos que presentaban coinfección con VHS [12]. De esta manera, el VHS pudiera estar implicado por distintas vías en los mecanismos por los cuales la combinación de agentes químicos y biológicos afecta la transformación maligna [14].

A nivel genético, es bien conocido a través de estudios citogenéticos que la carcinogénesis de células escamosas en la mucosa de cabeza y cuello involucra la acumulación progresiva de anormalidades genéticas en secuencias que regulan la progresión del ciclo celular, rutas de señalización mitogénicas y de diferenciación, angiogénesis y muerte celular, en un proceso llamado carcinogénesis de múltiples pasos que incluye deleciones, duplicaciones, translocaciones y re-arreglos de segmentos cromosómicos; otro mecanismo de cambios somáticos heredables en la expresión genética que no involucra la alteración directa de la secuencia del ADN se basa en modificaciones epigenéticas, especialmente la hipermetilación de ciertas regiones promotoras [15]. En dichos procesos pudiera participar el potencial mutagénico viral.

La dificultad para detectar el VHS mediante métodos moleculares, así como la variabilidad o disparidad de los resultados obtenidos por distintos investigadores, pudieran explicarse en diferencias en cuanto a la sensibilidad de los procedimientos utilizados y a las características de la muestra biológica, incluyendo secuencias de primers, características de la PCR, sondas utilizadas en protocolos de hibridación, tipo de lesión, estadio de la enfermedad y carga viral de las muestras analizadas. En este orden de

ideas, López y col.,[7] no lograron la detección de VHS mediante PCR en muestras de CCC, al contrario de Cox y col.[16], quienes mediante hibridación por *Southern Blot* detectaron secuencias genómicas de VHS 1 y VPH tipo 16 en biopsias de mucosa oral con patología maligna (12,5 %) y potencialmente maligna (50 %); sus resultados sugieren que VHS pudiera ser encontrado con mayor frecuencia en lesiones potencialmente malignas que en carcinomas y que la sinergia entre VHS y VPH puede ser un evento temprano en el desarrollo de cáncer oral. En este sentido, se ha señalado que la presencia o ausencia del ADN determinada por métodos moleculares como la PCR no refleja exposiciones pasadas (solo exposiciones presentes) y para la carcinogénesis, justamente las infecciones virales pasadas pudieran ser más importantes [17].

En este estudio se evaluó la presencia del VHS 1 y el VHS 2 en 45 muestras de CCC que previamente resultaron positivas para VPH, detectándose los virus en 37,7 % y 26,6 % de las muestras, respectivamente. A pesar de no haberse encontrado relación estadísticamente significativa entre la presencia del VHS con otros factores de riesgo o condiciones particulares de la patología (número de tumores, progresión, supervivencia, etc.), el porcentaje viral detectado es considerable y no debe descartarse la posibilidad de su participación en el desarrollo o evolución de la carcinogénesis. Similarmente, Parker y col.[18], en un estudio basado en pruebas serológicas, lograron detectar anticuerpos anti VHS1 y VHS2 en muestras de pacientes con cáncer de cabeza cuello que también presentaron anticuerpos frente a VPH tipo 16; los resultados obtenidos por estos investigadores sugieren que la seropositividad para VHS1 y VHS2, aunque no pudo ser considerada como factor independiente, pudiera modificar el riesgo asociado al CCC en combinación con otros factores como el tabaco, el alcohol o la infección por VPH. Larsson y col. [8], en un estudio que combinó hibridación por *Western Blot* para evaluar la reactividad contra una proteína herpética (ICP-4) y la detección de anticuerpos IgG contra VHS, encontraron una reactividad considerablemente mayor en la hibridación, así como mayor título de anticuerpos anti IgG para pacientes con CCC (80 %) en comparación al grupo control (50 %); estos investigadores también sugieren que la exposición prolongada al VHS pudiera incrementar el riesgo a desarrollar cáncer de cabeza y cuello.

Como se mencionó, todas las muestras evaluadas en este estudio eran positivas para VPH, lo que imposibilita relacionar la presencia de los dos virus en la patología. Sería recomendable realizar la detección del VHS en muestras negativas para VPH y estudiar la expresión de marcadores oncogénicos, así como el patrón de expresión de miARNs y variaciones en las secuencias de genes que incrementan la susceptibilidad al CCC (ADPRT, APEI, NER/BER, ERCC1, XPD) para hacer comparaciones entre las muestras que resultaron positivas y negativas en la detección de VHS, con miras a lograr una mayor o mejor comprensión de los procesos subyacentes en el desarrollo y evolución de esta malignidad y del efecto que produce en los mismos la infección o coinfección por VHS [19]. Este conocimiento es clave en el hallazgo de nuevos blancos para tratamientos y terapias, así como en la identificación de genes y rutas moleculares específicas que son alteradas en un tumor en particular.

En este estudio se obtuvo mediante PCR un porcentaje considerable de muestras de CCC positivas para VHS. Aunque no se encontró relación entre la infección por este virus con otros factores de riesgo en cuanto a características particulares de la patología, su detección apoya los resultados registrados en otros estudios moleculares y serológicos que sugieren al VHS como factor o cofactor de riesgo de esta malignidad.

Financiamiento: FONACIT, proyecto PG2005000408

REFERENCIAS

1. Avissar M, McClean M, Kelsey K, Marsit C. Micro RNA expression in head and neck cancer associates with alcohol consumption and survival. Carcinogenesis. 2009;30(12):2059-2063.
2. Starr J, Daling J, Fitzgibbons D, Madeleine M, Ashley R, Galloway D, et al. Serologic evidence of herpes simplex virus infection and oropharyngeal cancer risk. Cancer Res. 2001;61(23):8459-8464.
3. Alvarez I, Lazo P, Ramos S, Rodrigo J, Nunez F, Suarez C. Using polymerase chain reaction to human papillomavirus in oral and pharingolaryngeal carcinomas. Am J Otolaryngol. 1997;18(6):375-381.
4. Mork J, Lien A, Glattre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med. 2001;344(15):1125-1131.
5. Veitía D, De Guglielmo Z, Ávila M, Liuzzi J, Correnti M. Detección de VPH y expresión de p53 en carcinoma de cabeza y cuello. Rev Venez Oncol. 2009;21(3):123-131.
6. Laane C, Murr A, Mhatre A, Jones K, Lalwani A. Role of Epstein Barr virus and cytomegalovirus in the etiology of benign parotid tumors. Head Neck. 2002;24(5):443-450.
7. López A, Llorente J, Melón S, García J, García D, Suárez C. Detección del virus herpes simple y del virus epstein barr en carcinomas de células escamosas de vías aerodigestivas superiores. Acta Otorrinolaringol Esp. 2003;54:506-511.
8. Larsson P, Edstrom S, Westin T, Nordkvist A, Hirsh J, Vahlne A. Reactivity against herpes simplex virus in patients with head and neck cancer. Int J Cancer. 1991;49(1):14-18.
9. Das C, Schantz S, Shillitoe E. Antibody to mutagenic peptide of herpes simplex virus in young adult patients with cancer of the head and neck. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1993;75(5):610-614.
10. Raggin C, Modugno F, Gollin S. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: A focus on human papillomavirus. J Dent Res. 2007;86(2):104-114.
11. Park N, Li S, Xie J, Cherrick H. In vitro and animal's studies of the role of viruses in oral carcinogenesis. Eur J Cancer B Oral Oncol. 1992;28B:145-152.
12. Hara Y, Kimoto T, Okuno D, Minekawa Y. Effect of Herpes Simplex Virus on the DNA of Human Papillomavirus 18. J Med Virol. 1997;53(1):4-12.
13. Park N, Dokko H, Li S, Cherrick H. Synergism of herpes simplex virus and tobacco-specific N-nitrosamines in cell transformation. J Oral Maxillofac Surg. 1991;49(3):276-281.
14. Rubbin J, Tweardy D. Elevated levels of transforming growth factor α and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. Cancer Res. 1993;53(15):3579-3584.
15. Stadler M, Patel M, Couch M, Hayes D. Molecular biology of head and neck cancer: Risk and pathways. Hematol Oncol Clin North Am. 2008;22(6):1099-1124.
16. Cox M, Maitland N, Scully C. Human herpes simples-1 and papillomavirus type 16 homologous DNA sequences in normal, potentially malignant and malignant oral mucosa. Eur J Cancer Oral Oncol. 1993;29B(3):215-219.
17. Korodi Z, Dillner J, Jellum E, Lumme S, Hallmans G, Thoresen S, et al. Papillomavirus 16, 18 and 33 infections and risk of prostate cancer: A Nordic nested case-control study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005;14(12):2952-2955.
18. Parker T, Smith E, Ritchie J, Haugen T, Vonka V, Turek L, et al. Head and neck cancer associated with herpes simplex virus 1 and 2 and other risk factors. Oral Oncol. 2006;42(3):288-296.
19. Li C, Hu Z, Lu J, Liu Z, Wang L, El-Naggar A, et al. Genetic polymorphisms in DNA base-excision repair genes ADPRT, XRCC1 and APE1 and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer. 2007;110(4):867-875.