

Artículo original

Determinación de VPH y de la proteína p16 en lesiones periunguealesElba Lucía Rangel Gamboa,¹ María Elisa Vega Memije,¹ Joel Martínez Ocaña,¹ Judith Domínguez Cherit²**RESUMEN**

Antecedentes: las verrugas vulgares constituyen la lesión ungueal benigna más frecuente, y afectan principalmente a niños y adultos jóvenes. En cuanto a las lesiones malignas, el carcinoma espinocelular ocupa el segundo lugar, ya que representa 4.9% de todas las neoplasias encontradas en el aparato ungueal. Estudios epidemiológicos respaldados en tecnología molecular pusieron en evidencia el papel causal de la infección por el virus del papiloma humano (VPH) en el cáncer cervicouterino. Este virus también se ha implicado como agente causal de carcinomas espinocelulares en otras localizaciones, como la mucosa oral y las amígdalas.

Objetivo: determinar la presencia del virus del papiloma humano (VPH) y de la proteína p16 en carcinomas espinocelulares periungueales y verrugas vulgares periungueales.

Material y método: se estudiaron tejidos incluidos en bloques de parafina provenientes de pacientes del servicio de Dermatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González, atendidos entre enero de 2004 y julio de 2007, con diagnóstico histológico de carcinoma espinocelular periungueal o verrugas vulgares periungueales. La identificación del virus del papiloma humano se realizó mediante la técnica de PCR utilizando los oligonucleótidos Gy5-Gy6. La proteína p16^{ink4} se determinó mediante inmunohistoquímica.

Resultados: se incluyeron 18 pacientes, cinco de ellos con diagnóstico de carcinoma espinocelular periungueal y 13 con diagnóstico de verrugas vulgares periungueales resistentes a tratamientos convencionales. En 15 pacientes la inmunohistoquímica para p16 resultó positiva y en 12 casos se identificó ADN viral mediante PCR. Todos los casos positivos para VPH por PCR arrojaron inmunohistoquímica positiva para p16.

Palabras clave: VPH, proteína p16, periungueal, inmunohistoquímica.

ABSTRACT

Background: Vulgar warts are the most frequent benign peri and sub-ungueal lesions, and affect mainly children and young adults. As for the malignant lesions, squamous cell carcinoma occupies the second place in the ungueal unit, representing 4.9% of all the neoplasms found in the ungueal area. Epidemiological studies based on molecular technology demonstrated the causal role of the infection by human papillomavirus (HPV) in the cervical cancer. The HPV has also been involved as causal agent of squamous cell carcinoma in other locations such as oral and tonsils mucous.

Objective: To determine the presence of the human papillomavirus and protein p16 in periungueal squamous cell carcinoma and periungueal warts.

Material and method: Universe of study: tissues included in paraffin blocks from patients from Dermatology Service at General Hospital Dr. Manuel Gea Gonzalez from January, 2004 to July, 2007 with histological diagnosis of periungueal squamous cell carcinoma or periungueal vulgar warts. Identification VPH: We performed by means of PCR's technology with the primers Gy5-Gy6; protein p16^{ink4} was determined with immunohistochemistry.

Results: 18 patients were included, 5 with periungueal squamous cell carcinoma diagnosis and 13 with diagnosis of periungueal vulgar warts resistant to conventional treatments. In all patients, the immunohistochemistry for p16 was positive; in 12 cases we identified the viral DNA by means of PCR.

Key words: HPV, p16 protein, periungueal, immunohistochemistry.

¹ Subdirección de Investigación Biomédica. Hospital General Dr. Manuel Gea González.

² Jefa del Departamento de Dermatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Correspondencia: Dra. Elba Lucía Rangel Gamboa. Departamento de Ecología de Agentes Patógenos. Subdirección de Investigación Biomédica, Hospital General Dr. Manuel Gea González. Av. Calzada de Tlalpan 4800, colonia Sección XVI, CP 14080, México, DF. Correo electrónico: draluciarangel@yahoo.com.mx
Recibido: agosto, 2012. Aceptado: octubre, 2012.

Este artículo debe citarse como: Rangel-Gamboa EL, Vega-Memije ME, Martínez-Ocaña J, Domínguez-Cherit J. Determinación de VPH y de la proteína p16 en lesiones periungueales. Dermatol Rev Mex 2013;57:99-103.

www.nietoeditores.com.mx

En México, las verrugas vulgares constituyen la lesión ungueal benigna más frecuente; afecta principalmente a niños y adultos jóvenes. En cuanto a las lesiones malignas, el carcinoma espinocelular ocupa el segundo lugar, ya que representa 4.9% de todas las neoplasias encontradas en la unidad ungueal (Figura 1).¹ El conjunto de factores que contribuyen a la aparición del cáncer se conoce como carcinogénesis. El 80% de los tumores malignos en humanos se asocia con carcinógenos, moléculas que dañan el ADN o, bien, interfieren con su replicación o reparación. Estudios epidemiológicos respaldados en tecnología molecular pusieron en evidencia el papel causal de la infección



Figura 1. Imagen clínica de carcinoma espinocelular en una paciente de 37 años de edad.

por el virus del papiloma humano (VPH) en el cáncer cervicouterino.^{2,3} Además, se ha propuesto que este virus participa en la carcinogénesis de un diverso grupo de neoplasias epiteliales, incluido el cáncer de piel no melanoma;⁴ por ejemplo, la enfermedad de Bowen (carcinoma espinocelular *in situ*) en los dedos se vinculó con genotipos de alto riesgo, especialmente el genotipo 16.^{5,6} En pacientes con trasplantes renales, Jong y colaboradores demostraron una alta prevalencia de VPH en carcinomas espinocelulares y lesiones queratósicas benignas en áreas fotoexpuestas; estas últimas en sujetos con antecedente de cáncer de piel, lo que sugiere que el VPH puede participar en la patogénesis de este padecimiento; por ejemplo, con las radiaciones ultravioleta como cofactor.⁷

La estructura y dinámica del VPH se estudiaron a profundidad a fin de comprender de qué manera participan en la carcinogénesis.⁸ Este virus es pequeño, no encapsulado, con ADN de doble cadena,⁹ de 55 nm de diámetro.¹⁰ Los genotipos de alto riesgo pueden encontrarse en las células como episomas, pero también tienen la capacidad de integrarse en el genoma del huésped, induciendo la sobreexpresión de los oncogenes *e6* y *e7* que codifican para las proteínas E6 y E7, respectivamente.

En combinación con otras proteínas celulares, E6 degrada la proteína celular p53. Las altas concentraciones de p53 detienen el ciclo celular en la fase G1 o inducen apoptosis (muerte celular programada). La proteína E6 del virus facilita la destrucción de p53 en las células infectadas, removiendo el freno del ciclo celular en las células suprabasales de los epitelios queratinizados,¹¹ lo

que permite la replicación de queratinocitos que contienen ADN de origen viral; además, las células infectadas pueden tener mutaciones que en condiciones normales inducirían la apoptosis de los mismos.

Los productos del gen E7 se unen e inactivan a la proteína supresora de tumor retinoblastoma (pRB) en su forma no fosforilada.^{12,13} El papel fisiológico de la pRB desfosforilada es unirse e inhibir la función de la proteína E2F. Cuando los productos del gen E7 del VPH se unen a la proteína supresora de tumor retinoblastoma, entonces E2F es liberada de su supresión, e induce la síntesis de algunos genes que se requieren para activar la maquinaria de replicación del ADN; de esto resulta, entre otras cosas, el aumento de p16^{INK4A}, producto del gen *cdnk2A*.¹⁴ La p16^{INK4A} es una proteína supresora tumoral que inhibe las cinasas dependientes de ciclinas que participan en el control del ciclo celular; se ha encontrado sobreexpresada en displasias y carcinomas del cuello uterino,¹² en el tumor trofoblástico epitelioide,¹⁵ en neoplasias intraepiteliales anales,¹⁶ en queratosis actínicas y en enfermedad de Bowen.¹⁷

Por tanto, diferencias en la actividad de los genes E6 y E7 entre genotipos oncogénicos y no oncogénicos del virus del papiloma humano inducen riesgos distintos de progresión; las proteínas E7 derivadas de genotipos de alto riesgo oncogénico de VPH interactúan con mayor eficiencia con pRB que las de genotipos de menor riesgo.¹⁸

OBJETIVO

Determinar la presencia del virus del papiloma humano y de la proteína p16 en carcinomas espinocelulares y verrugas vulgares periungueales.

MATERIAL Y MÉTODO

Se estudiaron tejidos incluidos en bloques de parafina provenientes de pacientes del servicio de Dermatopatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González, atendidos de enero de 2004 a julio de 2007, con diagnóstico histológico de carcinoma espinocelular o verrugas vulgares de larga evolución que hubieran sido resistentes a tratamientos convencionales. Se definieron como lesiones resistentes las que tenían más de dos años de evolución, que recibieron al menos dos de los tratamientos convencionales contra verrugas vulgares, como podofilina, crioterapia, electrocirugía, etc.

Extracción de ADN en tejidos incluidos en parafina

Se colocaron, aproximadamente, 25 mg de tejido de cada muestra en tubos eppendorf de 2 mL; se realizaron pases sucesivos por xilol y etanol para extraer la parafina y rehidratar el tejido. Los tejidos libres de parafina se resuspendieron con 180 μ L de buffer ATL del sistema de extracción de ADN mediante columnas QIAamp Spin de Qiagen; se siguieron todos los pasos recomendados por el fabricante para la extracción de ADN de tejidos (www.qiagen.com). Una vez obtenido el ADN, se amplificó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los oligonucleótidos Gy5 y Gy6, que amplifican un fragmento de 155 pb del gen L1 del virus del papiloma humano.

Técnica para determinar la expresión del antígeno p16

Las laminillas que contenían los cortes de tejido se sumergieron en pases sucesivos de xilol y etanol (absoluto, 96 y 50%) durante 30 minutos cada uno, con el objetivo de extraer la parafina y rehidratar el tejido. Los tejidos libres de parafina se resuspendieron en el *buffer* de citratos (pH 6.0) para la recuperación antigénica, durante 10 minutos. Se procedió al bloqueo con una solución de metanol de 45 mL/H₂O₂ 5 mL durante 30 minutos, seguido de la incubación del tejido con el primer anticuerpo anti-p16^{INK4} humana en dilución 1:50 con PBS/BSA a 1% durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se aplicó el segundo anticuerpo biotinilado en dilución 1:400, y se dejó en incubación una hora. Se colocó estreptavidina-peroxidasa en dilución de 1:200 en PBS-BSA por una hora. Luego se aplicó diaminobencidina como sustrato durante 15 minutos.^{5,9} Por último se realizó la contratinción con hematoxilina. Todos los cortes se evaluaron al microscopio de luz.

RESULTADOS

Se incluyeron 18 pacientes, cinco con diagnóstico clínico e histológico de carcinoma espinocelular (Figura 2) y 13 con diagnóstico de verrugas vulgares periungueales resistentes a tratamientos convencionales (Figuras 3 y 4).

En los pacientes con carcinoma espinocelular, los límites de edad fueron 57 y 86 años, con promedio de 63.6 ± 18.96 años. En los pacientes con verrugas vulgares periungueales resistentes a tratamientos convencionales, el intervalo de edad fue de 9 a 74 años, con promedio de 45 ± 18.90 años.

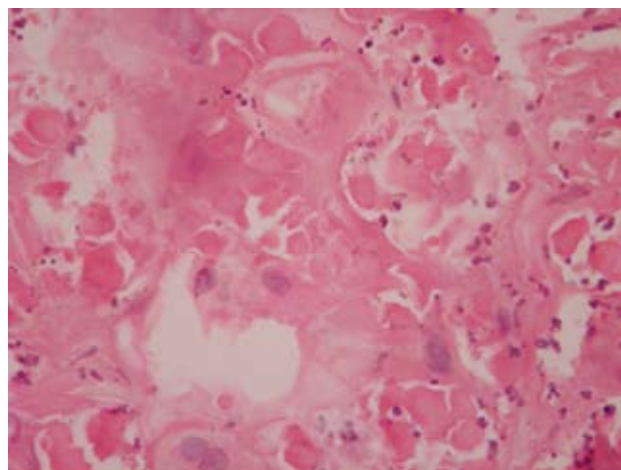


Figura 2. Imagen histológica de carcinoma espinocelular. Se observan núcleos grandes e hipercromáticos, queratinización individual. HE 40x.



Figura 3. Imagen clínica de verruga vulgar en una paciente de 58 años de edad.

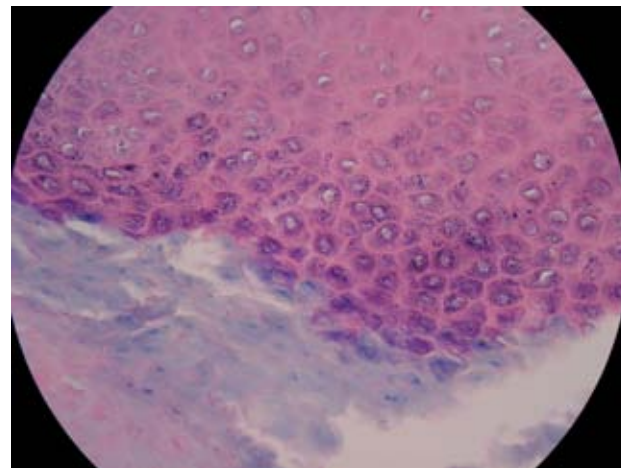


Figura 4. Imagen histológica de una verruga vulgar; se observan coilocitos en la capa granulosa. HE 40x.

Al comparar ambos grupos, se obtuvo una $p > 0.05$ no significativa. El grupo correspondiente a los individuos con carcinoma espinocelular estaba constituido por dos hombres (40%) y tres mujeres (60%); el de pacientes con verrugas vulgares periungueales, por tres hombres (20%) y 12 mujeres (80%). Al comparar ambos grupos se obtuvo un valor de χ^2 de 0.583, $p > 0.05$ no significativa, con prueba exacta de Fisher. En los pacientes con carcinoma espinocelular, el tiempo de evolución promedio fue de 23.4 ± 21.25 meses; en los pacientes con verrugas vulgares, el promedio fue de 42.76 ± 55.14 meses. Al comparar ambos grupos se obtuvo una $t = 0.463$, con $p > 0.05$ no significativa; por tanto, los dos grupos en estudio son comparables ya que no muestran diferencias significativas en las variables epidemiológicas.

En estos pacientes, la técnica de inmunohistoquímica fue 100% sensible para la expresión del antígeno (Figura 5), porque resultó positiva en todos los casos donde se detectó el virus por PCR, y altamente específica, similar a lo reportado en la bibliografía.

DISCUSIÓN

La técnica de inmunohistoquímica que utiliza anticuerpos para marcadores como p16 es una opción altamente sensible y específica para determinar la presencia de VPH de alto riesgo.^{2,19} p16 es un marcador indirecto, ya que hace evidentes los cambios genéticos inducidos por los geno-

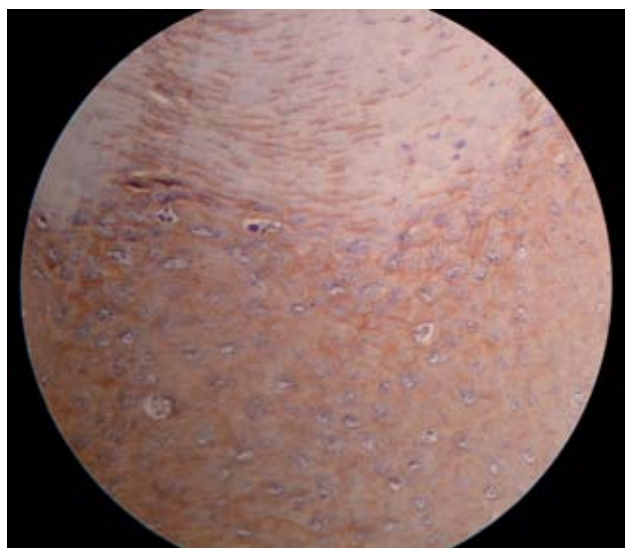


Figura 5. Tinción de inmunohistoquímica para p16, positiva en una verruga vulgar periungueal. 40x.

tipos de alto riesgo, mas no revela el genotipo específico. Santos y colaboradores demostraron que la técnica de inmunohistoquímica para determinar p16 era 100% sensible y 98.7% específica para identificar los carcinomas espinocelulares vulvares positivos para VPH.⁴ En un estudio similar de neoplasias intraepiteliales anales se halló una correlación de 80% entre la técnica de inmunohistoquímica para p16 y la determinación de ADN de genotipos de VPH de alto riesgo.¹⁸ En Japón, Murao y colaboradores reportaron un caso de enfermedad de Bowen en la planta del pie relacionado con VPH tipo 16 (detectado por PCR). En este caso, se utilizó la técnica de inmunohistoquímica para la proteína supresora tumoral p16, la cual se encontró clara y fuertemente positiva en el núcleo y el citoplasma de las células tumorales.²⁰

En esta serie, de los cinco casos de carcinoma espinocelular se excluyeron tres, ya que no se obtuvo suficiente ADN para realizar el estudio de PCR. Las dos muestras de carcinoma espinocelular que se procesaron y todas las muestras de verrugas vulgares periungueales resultaron positivas para el VPH por PCR y para la proteína p16 en la tinción de inmunohistoquímica. Por tanto, en esta serie se encontró una correlación alta entre el VPH y la detección de la proteína p16 por inmunohistoquímica, que resultó 100% sensible. Debido a la alta correlación que se observó entre la tinción de inmunohistoquímica para p16 y las muestras positivas para VPH por técnica de PCR, esta tinción podría utilizarse como marcador indirecto correspondiente a genotipos de VPH de alto riesgo en verrugas vulgares periungueales; sin embargo, en estudios posteriores deben secuenciarse los amplificadores obtenidos por PCR para definir con precisión los genotipos. Por último, los hallazgos en las muestras de carcinoma espinocelular sugieren la participación del VPH en la fisiopatología del carcinoma espinocelular periungueal, tal asociación se ha señalado en múltiples informes de casos, especialmente en los de Baran y colaboradores.²¹

REFERENCIAS

1. Domínguez-Cherit J, Chanussot-Deprez C, Vega-Memije E, Luis-Montoya P. Tumors of the nail unit: experience of hospital Dr. Manuel Gea Gonzalez Dermatology Department's in Mexico. *Ann Dermatol Venereol* 2006;132(2):182.
2. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer M, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55(4):244-265.

3. Santos M, Landolfi S, Olivella A, Lloveras B, et al. p16 over-expression identifies HPV-positive vulvar squamous cell carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2006;30(11):1347-1356.
4. Harwood CA, Proby CM. Human papillomavirus and non-melanoma skin cancer. *Curr Opin Infect Dis* 2002;15(2):101-114.
5. Ikenberg H, Gissmann I, Gross G, Grussendorf-Conen EI, Hausen H. Human papillomavirus type-16 related DNA in genital Bowen's disease and in Bowenoid papulosis. *Int J Cancer* 1983;32(5):563-565.
6. McGrae JD, Greer CE, Manos MM. Multiple Bowen's disease of the fingers associated with human papillomavirus type 16. *Int J Dermatol* 1993;32:104-107.
7. Jong-Tieben L, Berhout R, Schegget J, Vermeer B, et al. The prevalence of human papillomavirus DNA in benign keratotic skin lesions of renal transplant recipients with and without a history of skin cancer is equally high: a clinical study to assess risk factors for keratotic skin lesions and skin cancer. *Transplantation* 2000;69(1):44-49.
8. Carr J, Gyorfi T. Human papillomavirus. Epidemiology, transmission, and pathogenesis. *Clin Lab Med* 2000;20(2):235-255.
9. Zur Hausen H. Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2(5):342-350.
10. Boxman I, Mulder L, Russell A, Bouwes B, et al. Human papillomavirus type 5 is commonly present in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *Br J Dermatol* 1999;141(2):246-249.
11. Kong CS, Balzer BL, Troxell ML, Patterson BK, Longacre TA. p16INK4A immunohistochemistry is superior to HPV *in situ* hybridization for the detection of high-risk HPV in atypical squamous metaplasia. *Am J Surg Pathol* 2007;31(1):33-43.
12. Mantovani F, Banks L. The interaction between p53 and papillomavirus. *Semin Cancer Biol* 1999;9(6):387-395.
13. Sher C. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(10):731-737.
14. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998;153(6):1741-1748.
15. Mao TL, Seidman JD, Kurgan RJ, Shih IM. Cyclin E and p16 immunoreactivity in epithelioid trophoblastic tumor. An aid in differential diagnosis. *Am J Surg Pathol* 2006;30(9):1105-1110.
16. Walts AE, Lechago J, Bose S. p16 and ki67 immunostaining is a useful adjunct in the assessment of biopsies for HPV-associated anal intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2006;30(7):795-801.
17. Salama M, Mahmood MN, Querehi HS, Ma C, et al. p16INK4a expression in actinic keratosis and Bowen's disease. *Br J Dermatol* 2003;149(5):1006-1012.
18. González SL, Stremlau M, He X, Basile JR, Munger K. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functions inactivation and is separable from proteosomal degradation of E7. *J Virol* 2001;75(16):7583-7591.
19. Keating J, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, et al. ki-67, cyclin E and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001;25(7):884-891.
20. Murao K, Kubo Y, Takiwaki H, Aase S, Matsumoto K. Bowen's disease on the sole: p16INK4a overexpression associates with human papillomavirus type 16. *Br J Dermatol* 2005;152(1):170-173.
21. Baran R, Bertrand R. Common nail tumors. *Dermatol Clin* 2006;24(3):297-311.

XIX Seminario Internacional Clínico-Patológico de Dermatopatología

Fecha: sábado 10 de agosto de 2013
de las 08:00 a las 16:00 horas

Sede: Auditorio Dr. Abraham Ayala González, Hospital General de México.

Informes: Sociedad Médica: Tel. 5578-5222. Tel.-fax: 5578-0505
Dra. Patricia Mercadillo: Tel.-fax: 5004-3845

Profesor invitado: Prof. Dr. Eckart Haneke.
Departamento de Dermatología, Klinikk Bunass, Noruega

Dirigir correspondencia: Sociedad Médica del Hospital General, Auditorio Dr. Abraham Ayala González,
Hospital General de México. Dr. Balmis 148, colonia Doctores, CP 06726, México, DF.