

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

TESIS DOCTORAL

**COINFECCION POR PAPILOMAVIRUS HUMANOS Y HERPESVIRUS 6 COMO MECANISMO
PATOGENICO EN EL CANCER VESICAL Y SU IMPLICACIÓN EN LA PROGRESIÓN NEOPLASICA**

Alberto López Escudero

CORDOBA 2012

TÍTULO: Coinfección por papilomavirus humanos y herpesvirus 6 como mecanismo patógeno en el cáncer vesical y su implicación en la progresión neoplásica

AUTOR: Alberto López Escudero

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2012
Campus de Rabanales Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones

publicaciones@uco.es

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

TESIS DOCTORAL

COINFECCION POR PAPILOMAVIRUS HUMANOS Y HERPESVIRUS 6 COMO MECANISMO
PATOGENICO EN EL CANCER VESICAL Y SU IMPLICACIÓN EN LA PROGRESIÓN NEOPLASICA

Alberto López Escudero

CORDOBA 2012



TÍTULO DE LA TESIS: Coinfección por papilomavirus humanos y herpesvirus 6 como mecanismo patogénico del cáncer vesical y su implicación en la progresión neoplásica

DOCTORANDO/A: ALBERTO LÓPEZ ESCUDERO

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

ANTONIO LÓPEZ BELTRÁN, Catedrático de Universidad del Área de Anatomía Patológica del Departamento Especialidades Médico-Quirúrgicas de la Universidad de Córdoba y SOCORRO GARCÍA NAVARRO, Catedrática de Universidad del Área de Biología Celular del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba, INFORMAN:

Que el trabajo que lleva por título “Coinfección por papilomavirus humanos y herpesvirus 6 como mecanismo patogénico del cáncer vesical y su implicación en la progresión neoplásica” ha sido realizado en todo su desarrollo bajo su dirección en los Departamentos de Especialidades Médico-Quirúrgicas y Biología Celular, Fisiología e Inmunología de esta Universidad, por el licenciado D. ALBERTO LÓPEZ ESCUDERO. Consideran que dicho trabajo reúne los meritos suficientes para optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba y es idóneo para su presentación como Tesis Doctoral por la modalidad Indicis de Calidad, debido al alto índice de impacto del conjunto de trabajos publicados durante su desarrollo.

Y para que conste y surta los efectos oportunos donde proceda a los efectos oportunos, firman el presente informe.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 12 de junio de 2012

Firma del/de los director/es

Fdo.: Antonio López Beltrán

Fdo.: Socorro García Navarro

Publicaciones realizadas durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

1. López-Beltrán A., **Escudero A.L.**, Carrasco-Aznar J.C., Vicioso-Recio L. Human papillomavirus infection and transitional cell carcinoma of the bladder. Immunohistochemistry and in situ hybridization. *Pathol Res Pract.* 1996; 192: 154-9.
2. A. López-Beltrán, **A.L. Escudero**, L. Vicioso, E. Muñoz and J.C. Carrasco. Human papillomavirus DNA as a factor determining the survival of bladder cancer patients. *Br J Cancer.* 1996; 73: 124-7.
3. A. López-Beltrán and **A.L. Escudero**. Human papillomavirus and bladder cancer. *Biomed Pharmacother.* 1997; 51: 252-7.
4. **A. L. Escudero**, R. J. Luque Barona, A. Quintero, J. Alvarez-Kindelan, M.J. Requena, R. Montironi and A. López-Beltrán. Association of human herpesvirus type 6 DNA with human bladder cancer. *Cancer Lett.* 2005; 230: 20-4.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Antonio López Beltrán por su dedicación, apoyo y amistad a lo largo de todos estos años.

A mis padres

INDICE

OBJETIVOS	2
INTRODUCCIÓN	4
Patología de los tumores de la vejiga urinaria	4
Etiología y epidemiología del cáncer de vejiga	5
Virus del Papiloma Humano (HPV)	8
Estructura del genoma del HPV	12
El ciclo de vida del HPV	16
El mecanismo de la transformación inducida por el HPV y la progresión del cáncer	17
Herpesvirus	21
Herpesvirus 6 (HHV6)	25
Estructura del genoma del HHV6	26
Capacidad trans-activadora del HHV6	28
MATERIAL	29
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52
ANEXO: Publicaciones realizadas durante la presente Tesis Doctoral	76

OBJETIVOS

La historia natural del cáncer de vejiga urinaria es difícil de predecir debido a su heterogeneidad biológica. El riesgo de recidiva y progresión neoplásica hacia tumores invasivos, característico de los tumores de la vejiga urinaria, está relacionado con múltiples factores, y por tanto, el cáncer de vejiga se considera una enfermedad multifactorial. Con el fin de aportar conocimiento de índole patogénico en esta neoplasia, nuestro grupo ha desarrollado varios proyectos de investigación relacionados con el papel de ciertos virus en el cáncer de vejiga. En esta búsqueda, uno de los factores sobre los que se ha centrado nuestra investigación ha sido el posible papel de los papilomavirus humanos (HPV) ya que, aunque han sido frecuentemente asociados a displasias y carcinomas de cérvix uterino, y a condilomas acuminados, varios estudios también los relacionan con el carcinoma vesical.

Tras un estudio metodológico para determinar la técnica más correcta para la detección de HPV en carcinomas vesicales, nuestro trabajo se ha centrado en mostrar la asociación de los papilomavirus humanos con el carcinoma de células transicionales de vejiga (TCC), relacionando la presencia de su ADN detectado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la supervivencia de los pacientes, y con otros factores pronóstico clásicos como el grado, el estadio, la presencia de coilocitosis, la edad y el sexo.

Posteriormente, tras realizar un extensa revisión bibliográfica, queda patente que la presencia de HPV es un factor necesario pero no suficiente para la progresión en ciertas neoplasias, de ahí que hayamos buscado establecer el papel del Herpes Virus 6 (HHV6) y su posible función como cofactor de los HPV en el desarrollo del carcinoma vesical, dada su demostrada capacidad in vitro de trans-activación de éstos.

Los objetivos concretos desarrollados en los distintos trabajos presentados en esta Tesis

Doctoral son:

1. Estudio comparativo de distintas técnicas para determinar de la presencia de HPV en muestras fijadas en formol e incluidas en parafina.
2. Establecer la posible presencia de ADN de HPV y HHV6 en carcinoma urotelial de vejiga.
3. Establecer la correlación de la presencia de ADN de los virus estudiados con los parámetros clínico-patológicos de las muestras.
4. Establecer la posible coinfección de HPV y HHV6 como elemento patogenético en el carcinoma de vejiga.

INTRODUCCIÓN

Con 10,9 millones de casos nuevos y 6,7 millones de muertes al año, el cáncer es una enfermedad devastadora, suponiendo una inmensa carga a las personas afectadas y sus familias, así como a los sistemas de salud [149]. Durante los últimos 30 años ha quedado muy claro que varios virus desempeñan un papel importante en el desarrollo de varias etapas de los tumores humanos, de hecho, aproximadamente del 15% al 20% de los cánceres se asocian con infecciones virales [150, 151]. Se ha estimado que casi el 10% de la carga de cáncer en todo el mundo está vinculado a la infección por HPV [152].

Patología de los tumores de la vejiga urinaria

Un promedio de 260.000 nuevos casos de cáncer de vejiga urinaria son diagnosticados en el mundo cada año [149, 150]. Existen grandes variaciones regionales con tasas de incidencia altas en los EE.UU., Europa Occidental y del Norte África, mientras que la enfermedad es relativamente rara en Asia [150]. La incidencia ha ido en constante aumento desde hace décadas, pero en algunos países se ha observado recientemente una disminución [149, 150]. Aunque el cáncer de vejiga se considera una enfermedad de hombres y es relativamente raro entre las mujeres, el número de mujeres afectadas es comparable con el de cáncer de cuello de útero y de ovario [150]. El cáncer de vejiga se presenta principalmente como una enfermedad no músculo-invasiva, que tiene una alta recurrencia de un 50-70% con una tasa de progresión baja en un 15-25% de los pacientes [150, 151]. La alta tasa de recurrencia y la agresividad de estos tumores han dado lugar a un estrecho seguimiento de los pacientes. En

los EE.UU., Medicare informó que los gastos en los pacientes con cáncer de vejiga fueron los más altos en comparación con otros tipos de cáncer. La incidencia del cáncer de vejiga es casi cuatro veces superior en hombres que en mujeres y casi dos veces mayor en los caucásicos que en afroamericanos [149]. En la histología, más del 90% de los casos de cáncer de vejiga son carcinoma urotelial (de células transicionales) y se originan en células epiteliales que recubren la pared vesical interna [151], aproximadamente el 5% son carcinoma de células escamosas y menos del 2% son adenocarcinomas; el carcinoma de células pequeñas es aun menos común [149].

Etiología y epidemiología del cáncer de vejiga

El cáncer de vejiga es el sexto tipo de tumor maligno más común en los países desarrollados [149,150]. En los Estados Unidos, se ubica como el cuarto y noveno cáncer diagnosticado con más frecuencia en hombres y mujeres, respectivamente. Se estima que en 2007 cerca de 67.160 nuevos casos se diagnosticaron en los EE.UU. y 13.750 pacientes murieron a causa de carcinoma diseminado de mucosa urotelial [149]. La mayoría de los tumores de vejiga en los países occidentales son carcinomas uroteliales [150-152]. Sin embargo, el carcinoma de células escamosas de la vejiga es la presentación predominante en los países de Oriente Medio [152 ,154-156]; el adenocarcinoma y el carcinoma de células pequeñas de vejiga son menos comunes [153, 156].

La etiología del cáncer de vejiga no está totalmente conocida y clásicamente se ha asociado con factores de riesgo exógenos y ambientales. Los dos factores de riesgo mejor conocidos

para el cáncer de vejiga son fumar y la exposición ocupacional [150]. Parece que varios carcinógenos potenciales están inactivos y deben ser activados por enzimas controladas por variables genéticas, por esta razón, la susceptibilidad a los carcinógenos difiere entre los individuos y poblaciones.

Los fumadores tienen entre dos y cuatro veces el riesgo de la población general, siendo cinco veces en el caso de grandes fumadores; los carcinógenos involucrados son aún desconocidos. Se estima que son necesarios 20 años del hábito de fumar para el desarrollo de cáncer de vejiga y el riesgo se correlaciona directamente con el número de cigarrillos consumidos. El riesgo relativo de los fumadores de desarrollar cáncer de vejiga en comparación a los no fumadores es de 3:1, para los fumadores anteriores es 1,9:1. El mecanismo exacto por el cual el tabaco causa cáncer de vejiga no se conoce, pero carcinógenos uroteliales como la acroleína, el 4-amino-bifenilo, la arilamina, y radicales libres del oxígeno se han visto implicados. Por otra parte, el aumento en la duración del hábito, la intensidad del tabaco y el grado de inhalación, contribuyen significativamente al desarrollo del cáncer, mientras que los efectos beneficiosos del abandono del tabaco se han asociado con una reducción casi inmediata en el riesgo. En carcinomas uroteliales superficiales establecidos de la vejiga, asociados al tabaco, los fumadores que mantiene el hábito tienen peor supervivencia libre de recurrencia que aquellos que dejan de fumar en el momento de diagnóstico [150].

La exposición ocupacional a los tintes de anilina y las aminas aromáticas, como 2-naftilamina y bencidina, se ha implicado como el segundo factor de riesgo más común para el cáncer de vejiga. La bencidina, la amina aromática más cancerígena, se ha utilizado principalmente en la producción de tintes y como endurecedor en la industria del caucho. El grado de

carcinogénesis debida a la exposición profesional varía según el grado de la industrialización, así en países muy industrializados la exposición en el trabajo puede representar hasta una cuarta parte de todos los cánceres uroteliales. El período de latencia entre la exposición y el desarrollo de tumores suele ser prolongado. Las aminas aromáticas han sido prohibidas, pero se sabe que las personas expuestas a sustancias químicas de la combustión de carbón también tienen un mayor riesgo de cáncer de vejiga. El cáncer profesional de vejiga también se ha observado en los trabajadores del gas, pintores y los peluqueros. La nutrición también puede jugar un papel. Mientras que un suplemento de vitamina A supone una reducción del riesgo de cáncer de vejiga, los alimentos fritos y la grasa provocan un incremento del riesgo. Una alta ingesta de líquidos demostró en un estudio reducir el riesgo de cáncer de vejiga, aunque este dato sigue siendo controvertido. Se conoce como en Taiwán y Chile ha habido un aumento del riesgo en poblaciones con uso de agua potable con un alto contenido de arsénico, y estos y otros contaminantes del agua se están ahora estudiando activamente [150].

Otros factores implicados en el desarrollo y progresión de la cáncer de vejiga incluyen el uso de analgésicos, infecciones del tracto urinario incluyendo infecciones bacterianas, parasitarias, micóticas y virales, litiasis urinaria, radiación pélvica y los agentes quimioterapéuticos como la ciclofosfamida. Aunque la ingestión de cafeína ha sido reportada como un factor de riesgo para el cáncer de vejiga, los cálculos de riesgo para esta asociación disminuyen después de controlar el consumo de tabaco concomitante. Del mismo modo, se ha demostrado que, en el modelo de rata, las sacarinas que contienen edulcorantes artificiales inducen neoplasia vesical, pero los estudios epidemiológicos en humanos no han logrado establecer esta relación. Existe una relación entre el parásito de la

esquistosomiasis y el cáncer de células escamosas en la vejiga, más frecuente en el Medio Este [150].

Virus del Papiloma Humano (HPV)

Periódicamente, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) convoca una reunión de expertos en cáncer para revisar y actualizar la evidencia sobre los agentes carcinógenos potenciales. En febrero de 2009, la 100ª reunión monográfica de la IARC versó sobre la carcinogenicidad de los agentes biológicos, incluido el virus del papiloma humano. Uno de los objetivos principales de esta reunión era examinar las pruebas del potencial de cada uno de los más de 100 genotipos de HPV que causan cáncer [5]. Sobre la base de grandes series de casos, los meta-análisis, y los datos de laboratorio de múltiples estudios, doce genotipos de HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59) fueron considerados cancerígenos y el HPV 68 fue considerado probablemente cancerígeno.

Los HPV infectan el epitelio estratificado de la piel o las mucosas, donde causan verrugas benignas. De los 200 tipos de HPV [6] los más comunes (tipos 2 y 4) son los que causan verrugas en las manos y los pies de los individuos afectados [7]. Los HPV del tracto anogenital, de los cuales aproximadamente 40 han sido identificados, se dividen en los que confieren un "bajo riesgo" (tipos 6, 11, 42) o un "alto riesgo" (los tipos 16, 18, 31) para el cáncer de cuello uterino [7 -10]. Los estudios realizados por el laboratorio de Zur Hausen [85-90] proporcionaron la primera prueba evidente de que los HPV estaban presentes en los cánceres genitales. Después de más de 20 años de trabajo, los HPV son ahora reconocidos

como una causa necesaria en el 95% de los cánceres invasores del cuello uterino en todo el mundo [17].

Los HPV son los más comúnmente asociados con el cáncer cervical, aunque, ahora se sabe que muchos tipos de cáncer son inducidos por el HPV, incluidas los del pene, cáncer anal, oral y conjuntival [12, 18-21]. Los HPV de alto riesgo también se han implicado recientemente en el 30% aproximadamente de los cánceres orales [22]. De hecho, los HPV son responsables de casos de cáncer en las amígdalas, el paladar, las encías, la lengua y la laringe [23-31]. Los HPV de alto riesgo se han visto implicados en el tracto respiratorio superior y de pulmón [27, 32, 33]. Además, la evidencia sugiere que algunos cánceres digestivos también son HPV positivos [30, 34].

Ya que los HPV son algunos de los virus más extendidos y estables en la naturaleza no es sorprendente que múltiples tejidos sean su diana a la hora de inducir formación de tumores. De este modo, ciertos tipos, como el HPV-16 y HPV-18 (considerados HPV de alto riesgo) podrían tener también un papel etiológico en los tumores del tracto urogenital [35]. Varios estudios han observado una asociación entre la infección por HPV y el desarrollo de carcinoma de células transicionales (TCC) de la vejiga (Tabla 1). Sin embargo, la variabilidad en la frecuencia detectada, situada entre 0% y el 81% [36], hace que el papel del HPV en la carcinogénesis de la vejiga siga siendo controvertido.

Tabla 1. Estudios de varios tipos de HPV investigados en neoplasias uroteliales de vejiga urinaria

<i>Investigador</i>	<i>Técnica-Tipo HPV estudiado</i>	<i>Prevalencia</i>	<i>Tipo HPV detectado</i>
Kitamuta et al. (1988)	SBH-16	1/10 (10,0)a	16
Querci et al. (1988)	SBH.11	1/1 (100,0)a	11
Bryant et al. (1991)	HIS-6/11/16/18	12/76 (15,7)	16/18
Kerley et al. (1991)	PCR-6/11/16/18	1/21 (4,7)b	11
Anwar et al. (1992)	HIS-16	10/20 (50,0)	16
	PCR-6/11/16/18/33	39/48 (81,0)	16/18/33
Chetsanga et al. (1992)	PCR-6/11/16/18/31/33	1/44 (2,5)	16
Knowles (1992)	PCR-6/11/13/16/18/30/33/45/51	0/100 (0,0)	-
Lopez-Beltran et al. (1992)	HIS-6/11/16/18/31/33/35	9/18 (50,0)	16/18
Shibutani et al. (1992)	SBH-6/11/16/18/31/33	4/20 (20,0)	6/11/16/18/31/33
Furihata et al. (1993)	HIS-16/18/33	28/90 (31,1)	16/18/33
Salztein et al. (1993)	PCR-6/11/16/18/31/33	0/33 (0,0)	-
Song-ting et al. (1993)	PCR-16/18	28/53 (52,8)	16
		2/53 (3,7)	18
Wilezinsky et al. (1993)	SBH-6/16/18/31	1/22 (4,5)b	6
	PCR-6/16/18	1/22 (4,5)b	6
Agliano et al. (1994)	PCR-16/18	23/46 (50,0)	16/18
Ashfaq et al. (1994)	HIS-6/11/16/18/31/33	0/8 (0,0)c	-
Chang et al. (1994)	HIS-6/11/18/31/33/35/39/40/45/51/59	0/108 (0,0)	-
	PCR-6/11/18/31/33/35/39/40/45/51/59	0/108 (0,0)	-
Maloney et al. (1994)	PCR-6/11/13/16/18/31/32/33/35/45/51	1/22 (4,4) a,b	18
		0/20 (0,0)	-
Noel et al. (1994)	PCR-6/11/16/18/33	2/75 (2,7)a	16
Gopalkrishana et al. (1995)	HIS-16	1/10 (10,0)	16
	PCR-16/18	2/10 (20,0)	16
Kamel et al. (1995)	HIS-6/11/16/18/31/33	27/47 (57,0)	6/11/16/18/31/33
Kim and Kim (1995)	PCR-6/11/16/18	8/23 (34,8)	16/18
LaRue et al. (1995)	PCR-6/11/16/18/33	28/71 (39,0)	11/16
Lopez-Beltran et al. (1995)	HIS-6/11/16/18	12/76 (15,8)	16/18
Sano et al. (1995)	HIS-16/18	1/80 (1,3)	16
	PCR-6/11/16/18/31/33/42/52/58	0/80 (0,0)	-
Lopez-Beltran et al. (1996)	PCR-6/11/16/18	7/76 (9,2)	6/16
Mvula et al. (1996)	PCR-16/18	1/36 (3,0)	16
Tenti et al. (1996)	PCR-6/11/16/18/33	26/79 (32,9)	16/18
Chan et al. (1997)	PCR-6/11/16/18/31/33	6/20 (30,0)	18
Aynaud et al. (1998)	PCR-6/11/16/18/31/33	0/57 (0,0)	-
	ISH- 6/11/16/18/31/33	0/57 (0,0)	-
De Gaetani et al. (1999)	ISH- 6/11-16/18-31/33/35	3/43 (7,0)	6/11
		5/43 (11,6)	16/18
Tekin et al. (1999)	PCR-16/18	2/42 (4,8)	16
		9/43 (20,9)	31/33/35
Westenend et al. (2001)	ISH- 6/11-16/18-31/33/35	0/16 (0,0)b	-
Sur et al (2001)	PCR-6/11/16/18/31/33	1/91 (1,1)	16
	ISH- 6/11/16/18/31/33	0/0 (0,0)	-
Youshya et al. (2005)	IHQ- Genérico	47/78 (60,3)	Generico
	PCR- Genérico	0/98 (0,0)	-
Barghi et al. (2005)	PCR-6/11/16/18/31/33/35	2/59 (3,4)	6
		14/59 (23,7)	18
		2/59 (3,4)	33
		2/59 (3,4)	6/18
		1/59 (1,7)	18/33
Badawi et al. (2008)	PCR-16/18	16/36 (44,4)	16
		5/36 (13,9)	18
Ben Selma et al. (2010)	PCR-6/11/16/18/31/33/35/52/58	0/125 (0,0)	-
Yavuzer et al. (2010)	PCR-6/11/16/18/31/33/35/52/58	0/70 (0,0)	-
Shigehara K et al. (2011)	PCR-6/11/16/18/31/33/35/39/42/43/44/45/51/52/56/58/59/66/68	7/8 (87,5)	6/16/18/33/58/68

La asociación entre HPV y cánceres humanos específicos se basa en la frecuente detección del ADN del HPV en los tumores. Sin embargo, el método de detección empleado puede sesgar los datos clínicos epidemiológicos. Técnicas de detección poco sensibles pueden conducir a resultados falsos negativos y a la suposición de que el HPV no está asociado con el tipo de tumor concreto. Técnicas de detección más específicas también pueden generar resultados anómalos por detectar tipos previamente no caracterizados y, dada la heterogeneidad del virus del papiloma, esto puede ser de vital importancia tanto en la asignación de un papel causal como en la determinación y la eficacia de los procedimientos de selección [37].

Debido a sus propiedades biológicas, los HPV no pueden ser fácilmente cultivados en medios de cultivo de tejidos, lo que dificulta la preparación de antígenos para su detección rutinaria [38]. Además, las pruebas serológicas que detectan anticuerpos anti-HPV específicos no pueden ser utilizadas para fines diagnósticos, ya que estos anticuerpos son marcadores de la exposición acumulada de toda una vida a los distintos tipos de HPV [39]. Para fines diagnósticos están siendo utilizados los métodos basados en la detección de ácidos nucleicos HPV-específicos. Adicionalmente, la tipificación de cepas del HPV se realiza por medio de métodos biológicos moleculares [40]. Debido a la gran cantidad de tipos de HPV, los métodos para la determinación del genotipo son difíciles de estandarizar. A pesar de este hecho, existen varios métodos.

El Southern blotting se ha utilizado tradicionalmente para detectar los tipos de HPV en los tejidos humanos [192]. Esta técnica ofrece unos niveles de sensibilidad bien caracterizados, sin embargo, los resultados obtenidos se pueden complicar por otros factores como el

reordenamiento o pérdida de ADN viral en tumores malignos y algunos problemas técnicos [192].

La hibridación in situ (ISH) se ha utilizado con frecuencia para detectar y determinar el tipo de ADN del HPV con éxito variable. Algunos tumores no muestran ADN de HPV cuando se analizan por este método, mientras que otros muestran hasta el 90% de detección. La tasa de detección de la ISH depende de la especificidad de las sondas utilizadas [193]. La principal ventaja de la ISH es que se mantiene la arquitectura los tejidos y puede ser demostrada la infección de células específicas. En la actualidad los métodos de tipificación del virus se basan principalmente en técnicas de “Reacción en Cadena de la Polimerasa” (PCR) con primers consenso y/o degenerados, seguida de un ensayo adicional para el tipo de identificación específicos de HPV. Los métodos más utilizados de PCR para la detección de la HPV típicos de mucosa se basan en el set de primers MY09-MY11 [41], cuya diana de amplificación es la región L1 del genoma del HPV. Varios autores han informado acerca de la eficacia de la amplificación con estos cebadores, así como de una comparación del rendimiento de los métodos [42, 43].

Estructura del genoma del HPV

Los HPV son una familia de virus pequeños, sin envoltura, de doble cadena de ADN, que establecen una infección persistente que puede permanecer de manera subclínica en la piel o el tracto genital hasta 10-20 años, pero que con frecuencia pueden causar verrugas. El genoma del virus del papiloma es un pequeño círculo de ADN de unos 8 kb, que codifica

ocho proteínas importantes. Como es habitual en los virus de ADN, los genes inmediatos tempranos (E6 y E7) están involucrados en el control del ciclo celular (Figura 1) [7, 9, 10, 44].

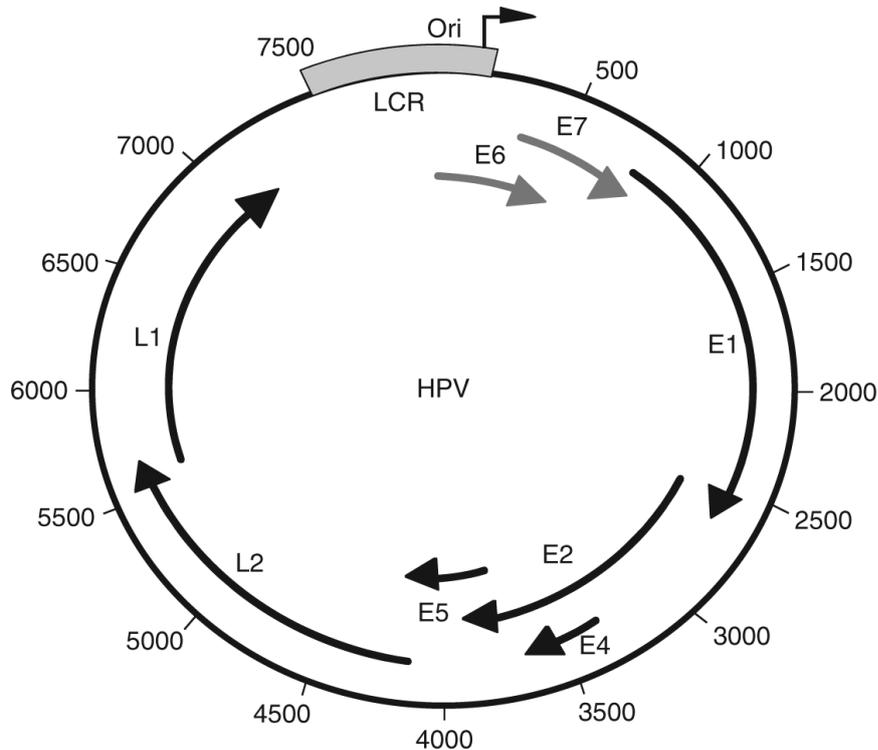


Figura 1. El genoma del HPV es una doble cadena circular de 7,9 kb. El genoma está controlado por un solo elemento promotor queratina-dependiente; la región de control largo (LCR). En el extremo 3' de la LCR está el origen de replicación. E6, E7 y E5 son los oncogenes virales; los genes tempranos E1 y E2 codifican las proteínas de replicación. El marco de lectura abierta (ORF) E4 tiene una expresión temprana y tardía en el ciclo de vida del virus. Los genes tardíos, L1 y L2, son los genes de la cápside mayor y menor, respectivamente.

A diferencia de los virus más complejos como el virus del herpes, el HPV utiliza la estrategia de replicarse con un número bajo de copias, y por lo tanto, no llevan su propio gen de la polimerasa. En cambio, los productos génicos codificados por E1 y E2 reclutan la α

polimerasa celular en el origen de replicación viral [7, 44-46]. El genoma está organizado de forma simple en los genes tempranos y tardíos, con sólo dos genes de la cápside, L1 y L2. Las funciones de las proteínas virales están bien establecidas y se resumen a continuación:

- **E6:** Oncoproteína Viral. Unión y degradación del supresor tumoral p53 a través de la actividad ubiquitina-ligasa E6AP, lo que resulta en la degradación de p53 por la vía mediada por ubiquitina; prevención de la apoptosis (Figura 2).
- **E7:** Oncoproteína Nuclear. Unión y degradación de la familia de productos supresores de tumores Retinoblastoma (Rb). Esto causa la liberación de E2F que induce la expresión de genes relacionados con la fase S (Figura 2).

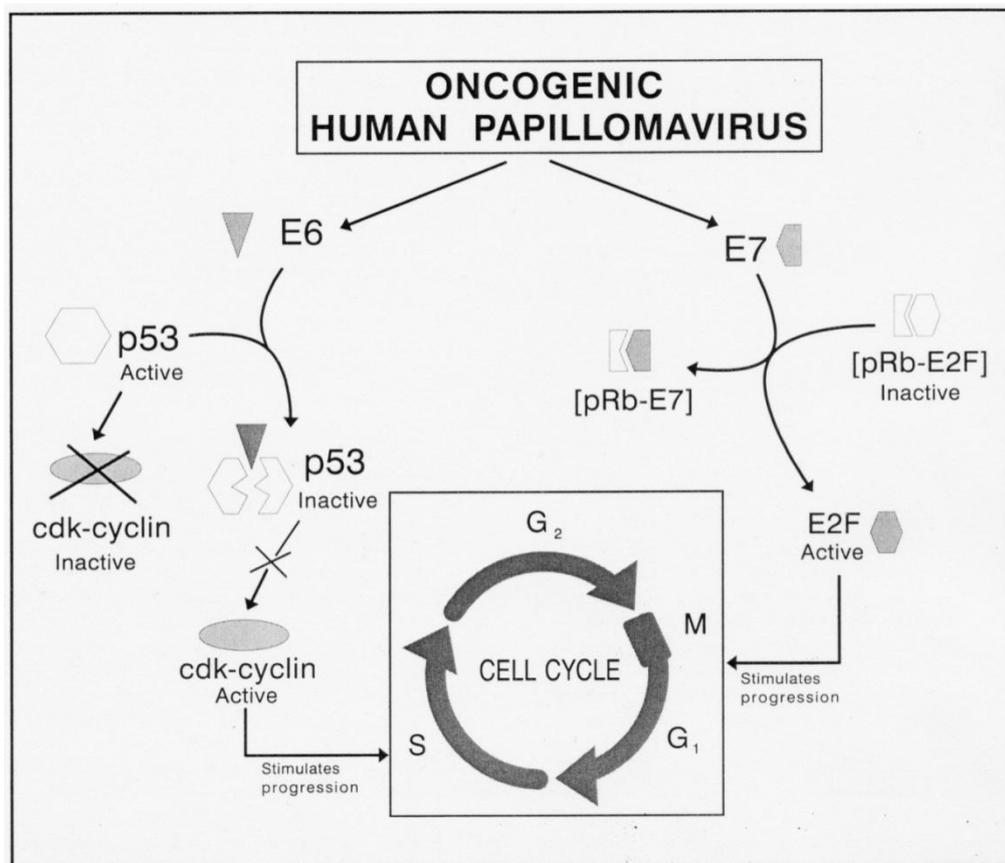


Figura 2. Esquema representativo de las funciones de las proteínas oncogénicas del HPV.

- **E1:** Helicasa de ADN dependiente de ATP. Con actividad de unión a ADN de cadena simple y doble. Necesaria para la replicación del ADN viral. Interactúa con la proteína E2 y con la ADN polimerasa α . Homología estructural significativa con el antígeno T del SV40 [47-49]. La unión específica de E1 a una secuencia de ADN está mediada por la proteína E2 del virus del papiloma; la asociación de E1 con E2 aumenta la afinidad de E1 por el ADN [45, 46].
- **E2:** Se liga a una secuencia palindrómica de 12 pares de bases: ACCGNNNNCGGT en la secuencia de origen (ORI) y funciona como un activador transcripcional; se une y recluta a la proteína E1 que estimula la iniciación de la replicación del ADN; E2 también funciona en el mantenimiento del genoma del HPV atando el ADN de nueva síntesis a los cromosomas durante la mitosis, lo que permite particiones iguales en las células hijas.
- **E4:** Expresada como una proteína tardía. Bloquea el ciclo celular en G2 / M; induce el colapso de la red de citoqueratina; posiblemente promotor de la liberación del virus; mal conservada a través de los tipos de HPV.
- **E5:** Oncoproteína viral, se une al receptor EGF. Capaz de transformar células de roedores en la cultivo; asociado a la membrana; sus funciones incluyen la unión a los receptores β del factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- **L1:** Proteína mayor de la cápside.
- **L2:** Proteína menor de la cápside.

El ciclo de vida del HPV

El HPV inicia su ciclo de vida mediante el acceso a los queratinocitos basales del epitelio estratificado, ya sea de la piel o la mucosa, a través de una herida u otro punto débil como en la unión de dos tipos de epitelios (Figura 3).

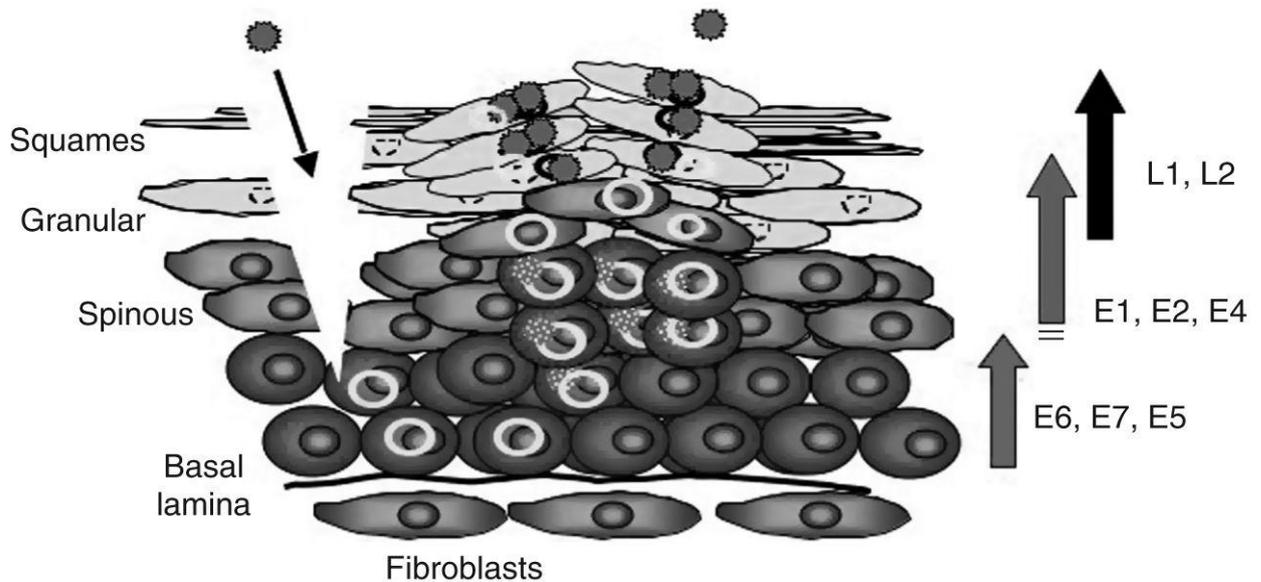


Figura 3. El ciclo de vida del HPV. Los viriones entran en el epitelio estratificado a través de una herida, donde tienen acceso a la actividad mitótica basal de la capa de queratinocitos. Durante la fase de mantenimiento, la expresión de E6, E7 y E5 induce la proliferación celular, y el genoma viral se replica extra-cromosomalmente en un bajo número de copias (5-50 copias por célula). Como las células se diferencian, el nivel de expresión de E1, E2 y E4 aumenta en la capa espinosa. Por amplificación posterior, los altos niveles de los genes de la cápside L1 y L2 se expresan y el ensamblaje de la cápside se produce en las capas granulares y del epitelio escamoso estratificado. La progenie del virus es liberado por la descamación.

La replicación del ADN del virus del Papiloma está estrechamente relacionada con el proceso de diferenciación de los queratinocitos en el epitelio escamoso infectado [50]. En las células epiteliales basales y parabasales, el HPV se mantiene como un episoma con un bajo número de copias (5-50 copias por célula) cuya replicación está bajo el control de las proteínas virales y de la célula acogida. Los queratinocitos infectados se diferencian y entran en la capa

del estrato espinoso del epitelio, dándose un aumento coincidente en la concentración de proteínas E1 y E2 [51]. La inducción de la replicación vegetativa es coherente con un cambio de mecanismos de replicación de modo “theta” a “rolling circle” [52]. Como consecuencia de este mecanismo “rolling circle” de replicación del ADN, se producen múltiples rondas de la síntesis del ADN viral en una determinada fase S de los queratinocitos de acogida [53] y un aumento en el número de copias hasta entre 100 y 1000 copias por célula. La replicación vegetativa del ADN del HPV requiere las proteínas codificados por el virus E1 (una ADN helicasa por ATPasa) y E2 (un trans-modulador transcripcional), y el inicio de la unión de E1 al sitio palíndromo cerca del extremo 5' de la región del virus de control largo [54].

El mecanismo de la transformación inducida por el HPV y la progresión del cáncer

Los HPV de alto riesgo (por ejemplo los tipos 16, 18, y 31) a menudo se encuentran integrados en el genoma del huésped [14, 55, 56]. El estado integrado del genoma viral no apoya el ciclo de vida del virus, pero puede conferir una ventaja de crecimiento a las células debido al incremento en la expresión de E6 y E7 [57]. Se cree que una combinación de la infección persistente por las cepas de alto riesgo junto con la incapacidad del sistema inmunitario de eliminar de forma adecuada el virus de las células infectadas, son los principales factores que contribuyen a la integración de los genomas del HPV en el ADN del huésped, un paso crítico en la tumorigénesis [58]. Como resultado de la integración, el marco de lectura abierta (ORF) de E2 es frecuentemente alterada, provocando una pérdida de expresión de E2 y su acción represiva en E6 y E7 (Figura 4), así como un aumento concomitante de los niveles de estas oncoproteínas [59].

La característica común de los cánceres es la expresión de los genes E6 y E7 que inactivan funcionalmente p53 y Rb, respectivamente [44, 60, 61] (Figura 4). En las cepas de HPV oncogénicos, las oncoproteínas E6 y E7 puede bloquear las vías de señalización celular de crecimiento negativo a través de las interacciones con las proteínas supresoras de tumor p53 y Rb. Como resultado, la proliferación de las células infectadas por HPV de alto riesgo se desregula y, a continuación, la transformación se desarrolla.

Las proteínas E6 de los HPV de alto riesgo tienen tanto actividad anti-apoptótica, como la capacidad de interferir con las funciones anti-proliferativas del supresor de tumores celulares p53. Para que esto ocurra, E6 forma primero un complejo con un ligasa celular ubiquitin- proteína E6AP, el complejo E6/E6AP actúa entonces como una ligasa específica ubiquitina-proteína de p53 para acelerar su degradación.

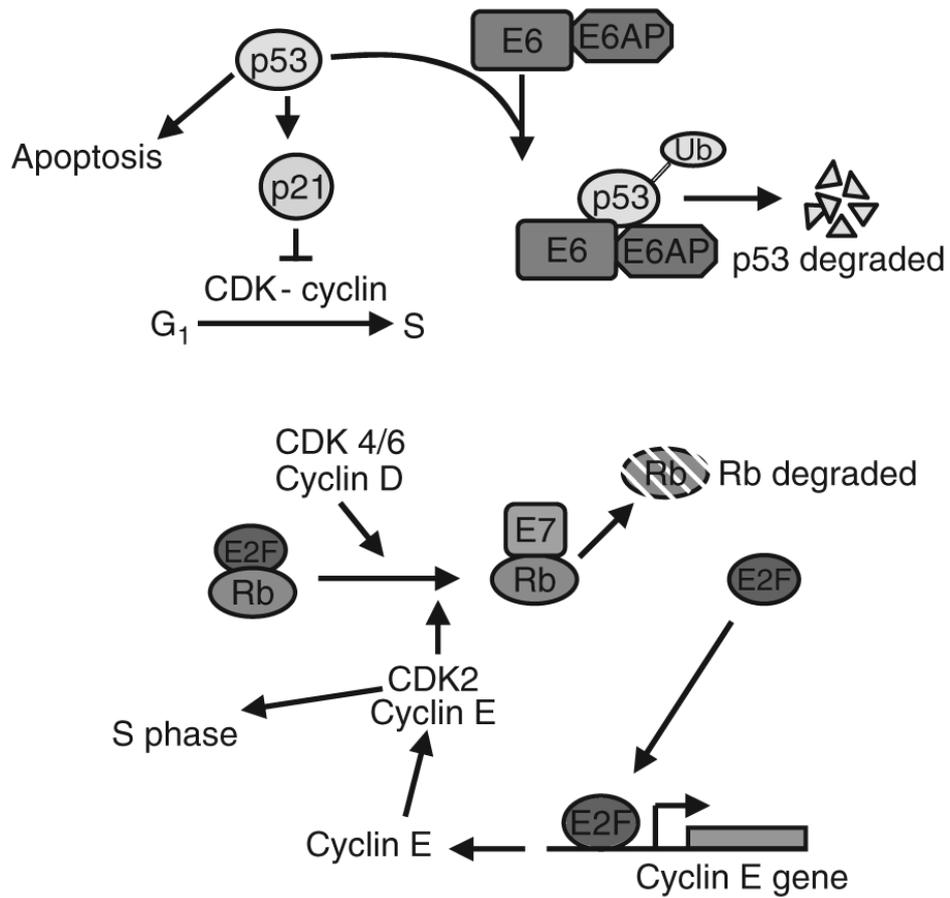


Figura 4. Diagrama de la función de E6 y E7 en la desregulación del ciclo celular. La expresión de E6 conduce al reclutamiento de E6AP (una ligasa ubiquitina). Este complejo causa de degradación de p53, lo que inhibe el bloqueo de la transición G1 a S dependiente de p21. Del mismo modo, E7 se une a Rb desplazando a E2F, lo que resulta en la degradación de Rb. E2F puede activar entonces la expresión de la ciclina E y los productos de otros genes relacionados con la fase S.

Otro paso crítico en la inmortalización de la célula impulsada por E6 es la activación de la telomerasa [62]. Es bien sabido que la expresión de E6 durante la infección un HPV de alto riesgo causa la regulación positiva del ARNm de hTERT (la subunidad catalítica de la telomerasa) a través de su interacción con la proteína celular asociada la proteína E6 (E6AP) [63]. La E6AP es la ubiquitina ligasa de E3 que junto con E6 es responsable de la degradación

de varias proteínas celulares [64], incluyendo p53 [65], durante una infección por HPV. E7 se une a proteínas miembros de la familia Rb resultando el desplazamiento de E2F y la eventual degradación de estos (Figura 4). La liberación de E2F le permite activar libremente genes relacionados con la fase S responsables de la transición de G1 a S. Así como E6 produce una inactivación de p53, lo que permite la síntesis sin restricciones de ADN, E7, mediante la liberación de E2F, activa la expresión de los genes necesarios para la síntesis de ADN celular. Incluso si el ADN celular está dañado, la falta de p53 permite a la célula sobrevivir a través de una fase S inducida por E7 y replicar el genoma viral.

Tanto E6 como E7 se unen a varios factores de transcripción implicados en la respuesta inmune inactivándolos, por ejemplo, IRFs. Esto sirve para evitar la destrucción basada en la respuesta inmune de los tumores que contiene HPV, mientras adquieren potencial invasivo mediante la modulación de otras vías [66].

Adicionalmente, las células que expresan E6 y E7 de HPV de alto riesgo presentan una disminución de la capacidad para mantener la integridad genómica [67]. La oncoproteína E7 del HPV de alto riesgo actúa como un mutador mitótico e induce a múltiples formas de alteraciones mitóticas, incluyendo puentes en anafase, desalineado o retraso de los cromosomas, y sobre todo mitosis multipolares [68]. Las mitosis multipolares son una característica histopatológica de las lesiones cervicales asociadas a HPV de alto riesgo y del cáncer [69] y son causadas por la capacidad de los HPV de alto riesgo para desacoplar la duplicación del centrosoma del ciclo de división celular [70]. Por lo tanto, las oncoproteínas E6/E7 del HPV contribuyen de una forma mecánica a la iniciación y progresión del cáncer.

La tasa de progresión de las lesiones del HPV, de la hiperplasia benigna al carcinoma in situ, se ve afectado por factores adicionales que incluyen funciones inmunológicas. Es bien sabido

que cofactores adicionales al estado inmunitario, como el alcohol, las drogas, el tabaquismo, los anticonceptivos orales y los niveles de hormonas, influyen en la infección por HPV y la progresión de los cánceres inducidos por el HPV. La capacidad de E6 y E7 del HPV de alto riesgo para la inactivación de p53 y Rb se correlaciona directamente con la probabilidad de desarrollar tumores. La coinfección por varios HPV, las variantes, la integración del genoma, así como otras enfermedades de transmisión sexual afectan a la propensión de que un cáncer inducido por el HPV se produzca y progrese. La coinfección por otros virus también puede ser un cofactor oncogénico.

Herpesvirus

La Herpesviridae es una gran familia que contiene más de 100 diferentes miembros, al menos uno por cada especie que ha sido examinada hasta hoy. Hay 8 herpesvirus humanos, todos muestran una estructura genómica en conjunto común, pero difieren en pequeños detalles en la organización genómica y a nivel de la secuencia de nucleótidos. La clasificación de los herpesvirus (Tabla 2) se basa en las propiedades biológicas y también en la estructura del genoma. Algunas de sus características son: nucleocápsides icosaédricas envueltas, diámetro de las partículas envueltas 180 a 250 nm y diámetro de las nucleocápsides desnudas 100 nm.

Tabla 2. Clasificación de la Familia de Herpesvirus

Familia Herpesviridae	
Subfamilia Alphaherpesvirinae	Huesped (Sintomas en hombre)
Género Simplexvirus	
<i>Herpesvirus humano 1 (HSV 1)</i>	Hombre (Infecciones orofaringe, ojos, piel y genitales; encefalitis grave y habitualmente fatal)
<i>Herpesvirus humano 2 (HSV 2)</i>	Hombre (Infecciones genitales)
<i>Herpevirus cercopitecino 1 (virus B)</i>	Hombre, monos (Encefalitis fatal)
<i>Herpesvirus bovino 2 (mamalitis bovina)</i>	Bovinos
Género Varicellovirus	
<i>Herpesvirus humano 3 (varicela zoster)</i>	Hombre (Varicela, herpes zoster)
<i>Herpesvirus porcino 1 (seudorabia)</i>	Porcinos
<i>Herpesvirus equino 1 (rinoneumonitis)</i>	Equinos
<i>Herpesvirus equino 4 (exantema coital)</i>	Equinos
<i>Herpesvirus bovino 1 (rinotraqueitis, IBRT)</i>	Bovinos
Subfamilia Betaherpesvirinae	
Genero Cytomegalovirus	
<i>Herpesvirus humano 5 (HCMV)</i>	Hombre (Ictericia, hepatoesplenomegalia, daño cerebral, muerte)
<i>Varios citomegalovirus</i>	Monos, equinos, gatos, porcinos
Genero Muromegalovirus	
<i>Herpesvirus murino 1 (CMV del ratón)</i>	Ratón
<i>Varios citomegalovirus</i>	Cobaya, hámster, rata, ardilla
<i>No asignado</i>	
<i>Herpesvirus humano 6</i>	Hombre (exantema súbito, roséola infantil, enfermedad de Duke, cuarta enfermedad)
<i>Herpesvirus humano 7</i>	Hombre
Subfamilia Gammaherpesvirinae	
Genero Lymphocryptovirus	
<i>Herpesvirus humano 4 (Epstein-Barr EBV)</i>	Hombre (mononucleosis infecciosa, linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo)
<i>Varios herpesvirus de primates</i>	Mandril, chimpancé, orangután
Genero Rhadinovirus	
<i>Herpesvirus atelino 2 (herpesvirus ateles)</i>	Mono araña
<i>Herpesvirus samairino 2 (h. saimiri)</i>	Mono ardilla
<i>Varios herpesvirus</i>	Gnú, liebre
Genero Thetalymphocryptovirus	
<i>Herpesvirus gallido 2</i>	Pollo
<i>Herpesvirus maleagrido 1</i>	Pavo

La familia está dividida en tres subfamilias basándose en sus propiedades biológicas.

- **Alfaherpesvirinae:** son virus neurotróficos. Los alfaherpesvirus tienen un espectro de huéspedes variables (desde muy amplio hasta muy estrecho); su ciclo de replicación por lo general es relativamente corto; con frecuencia son muy citopáticos en cultivos celulares; muchas veces establecen infecciones latentes en los ganglios sensoriales. Tamaño del genoma 120-180 kb. Ejemplo: virus herpes simples (HSV), virus de la varicela- zoster (VZV).
- **Betaherpesvirinae:** son los que producen cuerpos de inclusión en las glándulas salivales. Las células infectadas por ellos con frecuencia aumentan de tamaño (citomegalia). Tienen un ciclo de replicación relativamente prolongado y son menos citopáticos que los alfavirus; a menudo establecen infecciones latentes en las glándulas secretoras (glándula salival) y en otros tejidos, incluidas las células linfo-reticulares y los riñones. Tamaño del genoma 180-230 kb. Rango de huéspedes restringido. Ejemplo: citomegalovirus (CMV), HHV6.
- **Gammaherpesvirus:** comprenden los virus linfotróficos humanos, de primates no humanos y de vertebrados inferiores. Los gammaherpesvirus tienen un espectro de huéspedes estrecho y una predilección por las células linfoblastoides en las cuales con frecuencia establecen infecciones latentes pero a las que también pueden transformar (es decir, pueden inducir tumores); son específicos de los linfocitos B o de los linfocitos T. Tamaño del genoma 105-170 kb. Ejemplo: Epstein-Barr virus (EBV).

Los herpes virus tienen un genoma grande de una doble cadena lineal de ADN y corresponden a grandes y complejas partículas víricas, conteniendo más de 30 polipéptidos víricos. Los diferentes miembros de la familia están ampliamente separados en términos de secuencia de genoma y proteínas, pero todos son similares respecto a la estructura y organización del genoma. Los herpes virus son menos dependientes de las enzimas celulares que otros grupos de virus. Ellos codifican muchas enzimas envueltas en el metabolismo (por ejemplo timidina quinasas) y varios factores transactivadores que regulan la expresión temporal de los genes víricos, controlando las fases de la infección. La transcripción de su largo y complejo genoma es secuencialmente regulado a modo de cascada (Figura 5).

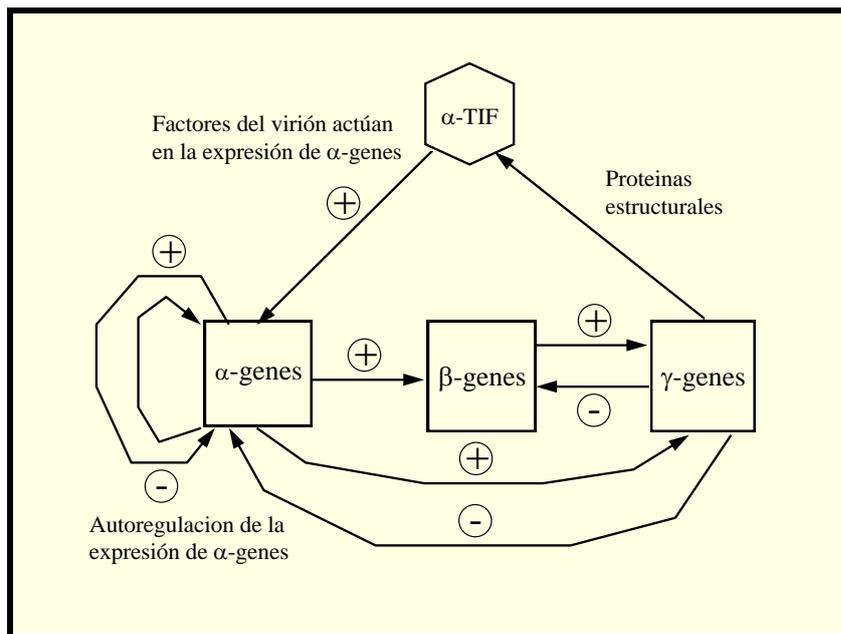


Figura 5. Control de la expresión del genoma de herpes virus. Las partículas de herpes virus contienen una proteína llamada α -TIF (α -factor iniciador de la transcripción de genes) que actúa sobre la expresión de los α -genes en las nuevas células infectadas, comenzando una cascada de eventos estrechamente regulados que controla la expresión de los restantes genes (70 y tantos genes en el genoma del virus).

Al menos 50 proteínas codificadas por el virus son producidas después de la transcripción del genoma por la ARN polimerasa II de la célula hospedadora. Tres clases distintas de ARNm son producidos:

- ARNm α -inmediatos-tempranos (IE): codifican 5 reguladores transactivadores de la transcripción vírica.
- ARNm β -(retrasados)-tempranos: codifican proteínas reguladoras no estructurales y algunas proteínas estructurales menores.
- ARNm γ -tardíos: codifican las proteínas estructurales mayores.

La expresión génica en herpes virus es regulada de forma rígida y coordinada. Las proteínas inmediatas-tempranas y las proteínas tempranas son requeridas para iniciar la replicación del genoma. Una ADN polimerasa dependiente de ADN codificada por el virus y una proteína unidora de ADN están involucradas en la replicación de genoma, junto con un número de enzimas (por ejemplo timidina quinasas) que alteran la bioquímica celular.

Herpesvirus 6 (HHV6)

El Herpesvirus Humano 6 (HHV6) está incluido en los betaherpesvirus humanos junto con el citomegalovirus humano (HCMV) y el herpesvirus humano 7 (HHV7). El HHV6 existe en dos variantes estrechamente relacionadas, HHV6A y HHV6B [71-74].

El HHV6 está muy extendido en todo el mundo, con diferencias geográficas en la prevalencia que varía entre 70 y 100% [71]. La seroprevalencia media de HHV6 en la población adulta se estima que es superior al 95% para ambos variantes en los países desarrollados, mostrando los títulos de anticuerpos una disminución con la edad [75-77]. El HHV6 se adquiere generalmente entre los 6 y 15 meses de edad [78], y el período de incubación es de 1 a 2 semanas. Se calcula que la infección primaria de HHV6 provoca el 20% de los casos de fiebre

aguda en niños entre 6 y 12 meses de edad [79] y es casi exclusivamente causada por el HHV6B, y no por el HHV6A [80, 81].

Estructura del genoma del HHV6

El genoma del HHV6 es lineal, una doble cadena de ADN, de 160 a 162 kb de tamaño, y consiste en una región única (U) de 143 a 145-kb, flanqueada por repeticiones directas (DR) terminales de 8 a 9 kb e interrumpida por tres repeticiones intermedias designadas R1, R2 y R3, en la región inmediata-temprana A (IE-A) (Figura 6). Al igual que el resto de herpesvirus, la estructura del HHV6 consta de tres elementos:

- i. una nucleocápside con simetría icosaédrica y un diámetro de 90 a 110 nm y que contiene el genoma del ADN viral;
- ii. una envoltura, en el que se insertan las glicoproteínas virales, y
- iii. el tegumento, que consiste en una mezcla de proteínas que ocupa el espacio entre la nucleocápside y la envoltura.

Los viriones maduros son aproximadamente de 200 nm de diámetro [82].

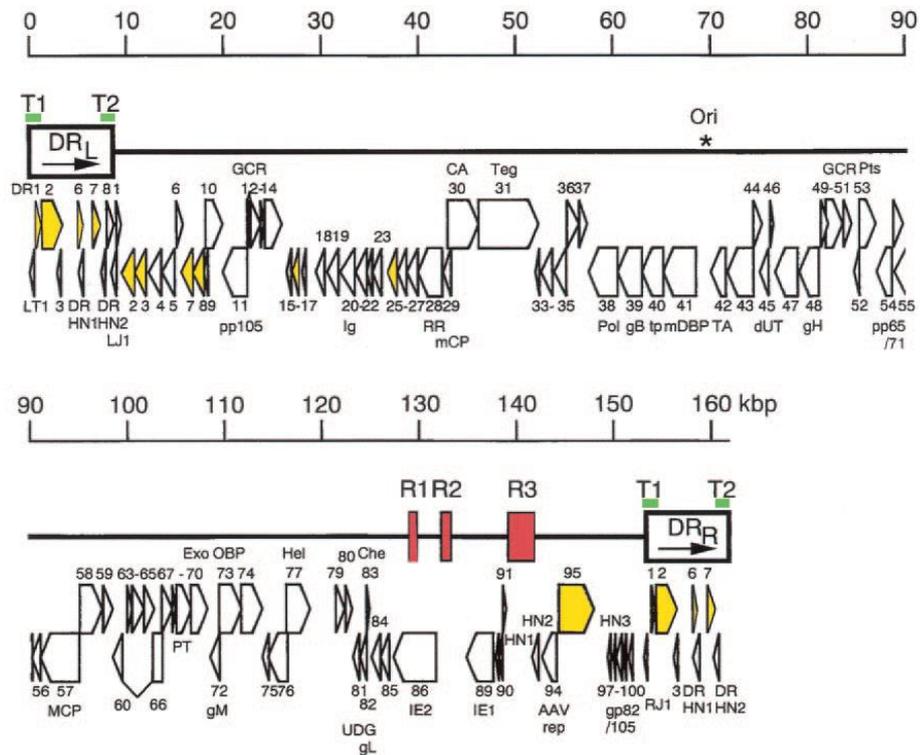


Figura 6. Representación esquemática de la organización genómica del HHV6B. Las repeticiones directas terminales (DRL y DRR) están recuadradas, y las repeticiones intermedias (R1, R2 y R3) se muestran como cuadros de color rojo. Las secuencias teloméricas (T1 y T2) se representan como barras de color verde. El origen lítico de replicación (ORI) está indicado por un asterisco. Las regiones codificantes de proteínas son representadas por flechas abiertas, las flechas de color amarillo indican los genes pertenecientes a la familia de genes US22 HCMV.

El genoma del HHV6B contiene 119 marcos de lectura abierta (ORF) (codificado por 97 genes), 9 de los cuales están ausentes en el HHV6A [83]. Por otra parte, nueve ORFs en el HHV6A [84] no tienen contrapartida en el genoma del HHV6B, como resultado de la falta o pérdida de un codón de iniciación y transiciones o transversiones de bases en el marco. Los genes en la región única son denominados de U1 a U100 y los ORF en las repeticiones directas son designados de DR1 a DR7, mientras que los 9 ORFs únicos para HHV6B se abrevian como B1 a B9. Los genes que codifican para los componentes estructurales del

virión o las enzimas necesarias para el metabolismo de los nucleótidos y la replicación del ADN, se agrupan en siete bloques (clústeres) de genes. Un bloque (clúster) adicional de genes, la llamada familia de genes US22, tiene una función que no está totalmente definida, aunque varios de sus miembros tienen potencial trans-activador [85-87].

Capacidad trans-activadora del HHV6

El genoma del HHV6 codifica una serie de proteínas que regulan trans-activando algún paso en la expresión de sus genes diana al unirse a elementos *cis*-activos (por ejemplo, una secuencia promotora); la mayoría de ellos se expresan en puntos inmediatos-tempranos, lo que no es sorprendente dado que las proteínas virales inmediatas-tempranas controlan la cascada temporal de la expresión genética viral. El potencial trans-activador de la infección por HHV6 fue reportado por vez primera sobre el VIH-1 LTR [88] y, desde entonces, éstas y otras funciones trans-activadoras han sido asignados a un número creciente de genes individuales del HHV6 como pDR7, la proteína codificada por el gen DR7 del HHV6A que ha demostrado la capacidad de transformar células de fibroblastos NIH 3T3. Su potencial oncogénico está relacionado con su capacidad para unirse e inactivar la proteína supresora tumoral p53 [89].

El HHV6 fue capaz de infectar cultivos de células epiteliales de cuello uterino humano que albergaban HPV latentes, aumentándose así la expresión de ARNm del HPV. Por otra parte, las proteínas codificadas por el gen U16 del HHV6 (previamente designado pZVB-70) y el clon genómico pZVH -14 (que abarca U30) transactiva genes transformantes de HPV [90].

MATERIAL

Se ha trabajado con dos series de estudio. La primera para mostrar la asociación de los papilomavirus humanos con el carcinoma de células transicionales de vejiga. El grupo de estudio consistió de 76 casos no seleccionados y consecutivos de carcinoma de células transicionales de vejiga urinaria recibidos en el Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España). Todos los 76 pacientes fueron sometidos a resección transuretral (RTU). Su edad media fue de 66.57 ± 1.17 . Catorce pacientes eran mujeres. Muestras seleccionadas de tejido de todas las biopsias, fijadas en formol y embebidas en parafina, se analizaron para determinar el grado patológico y el estadio. Todos los casos fueron seguidos durante 5 años.

La segunda serie fue estudiada principalmente para establecer el papel del Herpes Virus 6 y su posible función como cofactor de los HPV en el desarrollo del carcinoma vesical. La serie incluyó 74 muestras de tumor y 22 muestras de tejido no maligno de vejiga (urotelio normal $n=10$; cistitis crónica inespecífica $n=12$) que fueron recuperados del archivo del Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España). Las muestras obtenidas mediante resección transuretral o cistectomía fueron fijadas en formol e incluidas en parafina siguiendo el procedimiento estándar. La edad media de los pacientes fue 61.8 ± 7.3 (rango 43-78). Seis (6,2%) pacientes fueron mujeres. Los tumores se clasificaron de acuerdo con los criterios de gradación de la OMS (Organización Mundial de la Salud) y los criterios de estadio clínico TNM (Tumor, Nodo, metástasis) en su revisión de 2002 [15,16]. Se incluyeron 38 (51,3%) de bajo grado superficial (estadio Ta o T1) y 36 (48,7%) de alto grado (estadios T2-T4); 17 (23%) tenían asociado carcinoma urotelial in situ. Para el estudio se seleccionaron bloques de parafina representativos en base a la cantidad de tumor presente.

RESULTADOS

Nuestra primera serie de estudio consistió en 76 casos no seleccionados y consecutivos de Carcinoma de Células Transicionales (TCC) de vejiga urinaria recibidos en el Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España). Se seleccionaron muestras de tejido de todas las biopsias, fijado con formalina en parafina y fueron analizadas para determinar el grado patológico y el estadio. Todos los casos fueron seguidos durante 5 años. La coilocitosis en TCC se evaluó siguiendo los criterios propuestos por Hartveit et al. (1992).

En esta serie se estudio la presencia de HPV mediante la detección de antígeno de la cápside (HPVcAg) de HPV, la hibridación in situ (ISH) para determinación de la presencia de ADN de HPV mediante sondas específicas para las agrupaciones de tipo 6/11, 16/18 y 31/33/35 y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con primers específicos para determinar independientemente la presencia de los HPV tipo 6, 11, 16 y 18. Los resultados de los casos positivos para cada una de las tres técnicas se recogen en la Tabla 3. Todos los casos positivos para ISH o PCR estuvieron incluidos en el grupo de los 25 positivos por inmunohistoquímica. Cuatro de los casos positivos por ISH (todos ellos positivos para HPV 16/18) fueron positivos para la PCR de HPV16, mientras que tres casos positivos por PCR para HPV 16 (uno de ellos a su vez también positivo para HPV 6) resultaron negativos por ISH para cualquiera de los tipos estudiados.

Tabla 3. Casos positivos mediante la detección inmunohistoquímica de antígeno de la cápside (HPVcAg) de HPV, ISH para HPV 16/18 y PCR para HPV 16.

N. Caso	Edad	Sexo	Seguimiento (meses)	Grado	Estadio	ISH HPV 16/18	PCR HPV 16
1	80	M	MPE 42	II	A	+	-
2	62	M	MPE 11	III	C	+	-
3	51	M	SEE 60	II	A	+	-
4	46	M	MPE 28	III	B	+	-
5	75	F	MPE 10	III	C	+	-
6	51	M	MPE 24	III	B	+	-
7	64	F	MPE 12	II	A	+	-
8	78	M	SEE 60	II	A	+	-
9	64	M	MPE 13	III	B	+	+
10	85	M	MPE 10	III	A	+	+
11	60	M	MPE 9	III	B	+	+
12	51	M	SEE 60	I	A	+	+
13	73	M	MPE 17	II	A	-	-
14	61	F	SEE 60	II	A	-	-
15	74	M	SEE 60	I	A	-	-
16	78	M	MPE 36	III	A	-	-
17	50	M	SEE 60	I	A	-	-
18	66	M	SEE 60	III	A	-	-
19	60	M	SEE 60	II	A	-	-
20	75	M	SEE 60	II	A	-	-
21	60	M	SEE 60	II	A	-	-
22	83	M	SEE 60	III	B	-	-
23	64	M	MPE 10	III	B	-	+ ^a
24	57	F	SEE 60	I	O	-	+
25	57	F	MPE 13	III	B	-	+

a: Reactividad para ADN de HPV tipo 16 y 6; M: Masculino; F: Femenino; MPE: Muerto por enfermedad; SEE: Sin evidencias de enfermedad.

El análisis por PCR mostró señales positivas para el ADN del HPV tipo 16 en 7 (9,21%) de 76 casos investigados. Del mismo modo, un caso mostró reactividad para ADN tanto de HPV 16 como de HPV 6 (Figura 7).

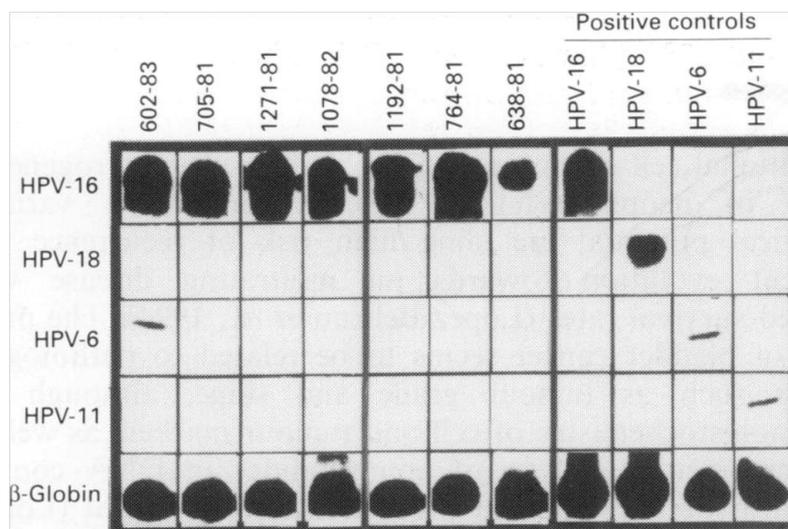


Figura 7. Autorradiografías de señales positivas para el ADN de HPV tipo 16 y tipo 6 mediante análisis de PCR.

Dieciséis (21,0%) de los 76 casos presentaron coilocitosis, y uno de ellos ADN de HPV tipo 16. La mayoría de los pacientes con TCC (71,4%) asociado a ADN de HPV fueron de alto grado o estadio patológico, y murieron de la enfermedad dentro de los 9 a 13 meses (Tabla 4).

Tabla 4. Características histopatológicas de los siete casos de TCC asociados con ADN de HPV

N. Caso	Edad	Sexo	Seguimiento (meses)	Grado	Estadio	PCR 16	Coilocitosis
14	64	M	MPE/13	III	B	+	-
16	64	M	MPE /10	III	B	+ ^a	-
17	85	M	MPE /10	III	A	+	-
22	60	M	MPE /9	III	B	+	-
24	57	F	SEE/60	I	O	+	+
28	57	F	MPE /13	III	B	+	-
30	51	M	SEE/60	I	A	+	-

a: Reactividad para ADN de HPV tipo 16 y 6; M: Masculino; F: Femenino; MPE: Muerto por enfermedad; SEE: Sin evidencias de enfermedad.

El análisis univariado de chi-cuadrado para la prueba de Wilcoxon mostró el grado patológico y el estadio, la presencia de ADN de HPV 16 y la coilocitosis, significativamente relacionados con la supervivencia en todos los 76 casos. Sin embargo, el grado patológico resultó ser un factor pronóstico independiente en la supervivencia del paciente (análisis de regresión de Cox).

Como resultado adicional concluimos en que la carcinogénesis vesical es un proceso complejo, de múltiples pasos con una etiología multifactorial. Así, la infección por HPV puede desempeñar un papel en el carcinoma de la vejiga. El HPV puede estar involucrado de forma más activa en la patogénesis del cáncer de vejiga en pacientes inmuno-suprimidos. La asociación de ADN del HPV 16 con el mayor grado y estadio de los tumores de la vejiga puede sugerir un valor adicional y pronóstico de la infección viral en un subgrupo de pacientes con cáncer de vejiga. En cualquier caso como ha sido publicado, parece ser que la presencia del HPV es necesaria, pero no suficiente, para el desarrollo de lesiones premalignas y malignas del tracto genital.

Nuestra segunda serie de trabajo consistió en 74 muestras de tumores y 22 especímenes de tejido no maligno de vejiga urinaria (urotelio normal n=10; cistitis crónica inespecífica n=12) recuperados de los archivos del Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España). Los tumores se clasificaron de acuerdo con los criterios de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y después se clasificaron clínicamente según la revisión 2002 de la clasificación TNM (Tumor, Nodo, Metástasis). El grupo incluía 38 (51,3%) tumores superficiales de bajo grado (estadio Ta o T1) y 36 (48,7%) de alto grado (estadio T2-T4); 17 (23%) tenían asociado carcinoma urotelial in situ. Fueron seleccionados bloques de parafina

representativos en base a la cantidad de tumor presente y se realizaron la evaluación de la expresión de p53 por inmunohistoquímica. P53 se cuantificó a continuación, utilizando el método de conteo de red para establecer una índice de tinción (porcentaje de núcleos positivos en 1000 células). Un índice $\geq 10\%$ se consideró positivo para sobre-expresión de p53.

El ADN del virus del herpes humano tipo 6 B estaba presente de cinco hombres (6,8%) de los 74 tumores investigados, dos de ellos tenían asociado ADN de papilomavirus humano tipo 16 (40%) en el mismo caso, lo que representa el 16,7% del número total de casos con ADN del HPV 16 (n = 12) en la serie de 74 tumores de vejiga (Figura 8).

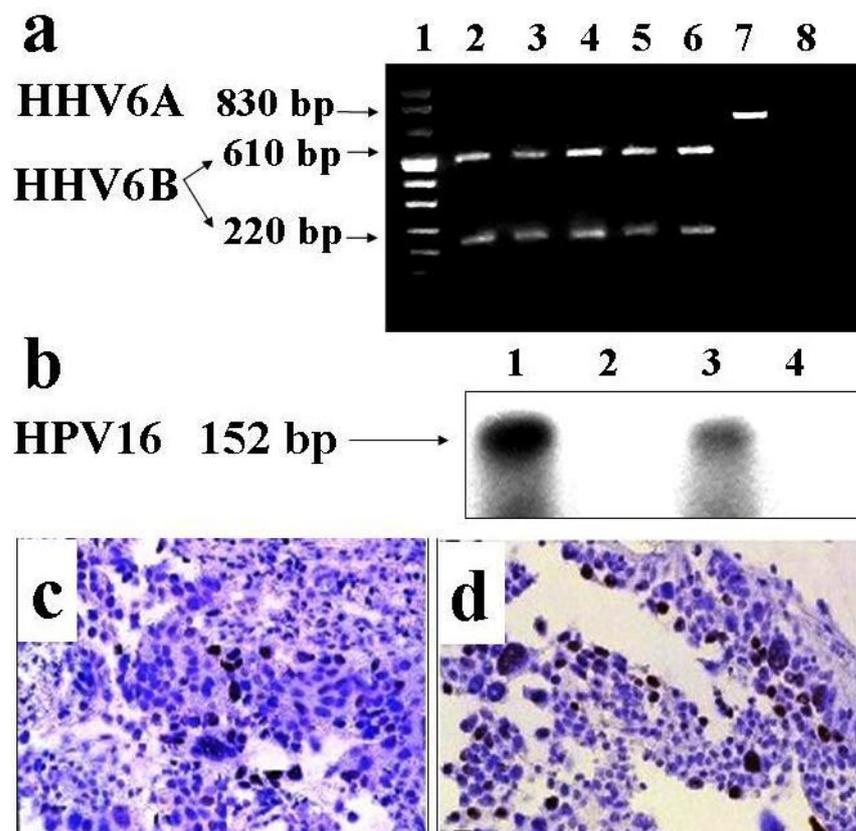


Figura 8. (A) Electroforesis en gel de agarosa que muestra los patrones de restricción de longitud de los fragmentos del virus del herpes humano tipo 6 en el carcinoma de vejiga. Carril 1: Marcador de peso molecular: VIII Roche 19 a 1114 pb. Carriles 2-6: Muestra del paciente tratada con endonucleasa HindIII, dando así dos

bandas de alrededor de 610 y 220 pb que es el patrón de restricción característico del virus del herpes humano tipo 6B. Carril 7: muestra de control sin restricción que muestra una banda de aproximadamente 830 pb que es característica del virus del herpes humano tipo 6A. Carril 8: control negativo. (B) Autoradiografía de PCR con señal positiva para amplificado de ADN del virus del papiloma humano tipo 16, en el carcinoma vesical co-infectado con virus del herpes tipo 6B (caso 4). Carril 1: Control positivo. Carril 2: Control negativo. Carril 3: Muestra del paciente. Carril 4: Muestra en blanco. (c y d) Expresión inmunohistoquímica de p53 en el caso positivo para herpes virus humano tipo 6 B. (c) Resultado negativo (expresión en < 10% de las células tumorales) en el caso 3 y (d) resultado positivo (expresión en $\geq 10\%$ de las células tumorales) en el caso 4 (método biotina-peroxidasa y estreptavidina, c, d, x250).

Un caso con carcinoma urotelial in situ asociado, presentó ADN tanto de HHV6B como de HPV 16 (Tabla 5).

Tabla 5. Hallazgos clínicos y patológicos en los cinco casos de carcinoma vesical urotelial que mostraron ADN del virus herpes humano tipo 6B.

Caso	Sexo/edad (años)	Tipo tumor	Grado/Estadio ^a	HPV 16	HHV6B	p53
1	M/51	CU	HG/T4N1M1	-	+	+
2	M/66	CU	HG/T3N0M0	-	+	+
3	M/59	CU	HG/T1N0M0	-	+	-
4	M/53	CU	HG/T3N1M1	+	+	+
5	M/60	CU+CIS	HG/T2N0M0	+ ^b	+ ^b	-

M: Masculino; CU: carcinoma urotelial; CIS: carcinoma urotelial in situ; HPV16: ADN de virus del papiloma humano tipo 16; HHV6B: ADN de virus herpes humano tipo 6B; p53: expresión inmunohistoquímica de p53 (- (negativo) <10% vs + (positivo) $\geq 10\%$). a: Grado de acuerdo a clasificación de la OMS y el estadio clínico según revisión de 2002 de la TNM. b: CU y CIS con HPV16 y HHV6B.

Ninguno de los 22 especímenes no malignos de vejiga investigados mostró HHV6 o HPV y en ninguno de los tumores investigados en el presente estudio se detectó HHV6A. Las características clínicas y patológicas de los pacientes positivos para HHV6 incluyeron en todos los casos tumores de alto grado [cinco (13,9%) de los 36 tumores de alto grado]. Un paciente presentó estadio T1 y los cuatro restantes tenían estadios T2-T4 (significación

estadística: $p = 0,023$, prueba exacta de Fisher). Tres de los casos, con estadios T3-T4 sobre-expresaron p53 ($\geq 10\%$) y dos casos con estadio T1 o T2, respectivamente, presentaron tumores p53 negativos ($<10\%$).

DISCUSIÓN

Una de las neoplasias más comunes, especialmente en los países en desarrollo, es el carcinoma de células transicionales (TCC) de vejiga. El TCC de vejiga es un grupo heterogéneo de neoplasias que suelen presentar un potencial biológico variable, incluyendo un alto riesgo de recurrencia y la frecuente evolución hacia una enfermedad infiltrante con tasas de supervivencia reducida [91]. Varios agentes químicos se consideran sospechosos de tener un papel en su desarrollo. El pronóstico del cáncer de vejiga parece estar relacionado con factores patológicos como el grado tumoral y el estadio, aunque la inmunohistoquímica de marcadores tumorales, así como el análisis por citometría de flujo, de anomalías en el contenido de ADN, también se han considerado importantes en el pronóstico [92].

Los HPV podrían desempeñar un papel etiológico en los tumores genitales, pero el efecto exacto de este virus en el carcinoma de células transicionales de vejiga es todavía impreciso, por lo que nuestro grupo se interesó en el tema abordando inicialmente un estudio metodológico de las distintas técnicas para determinación de la presencia de HPV en muestras fijadas en formol e incluidas en parafina. Posteriormente se buscó establecer la presencia de ADN de HPV en muestras de carcinoma vesical y la correlación de la presencia de ADN de los virus estudiados con los parámetros clínico-patológicos de los casos. Finalmente con una nueva serie de casos se buscó establecer la posible co-infección de HPV y HHV6 como elemento patogenético en el carcinoma de vejiga.

Más de dos década atrás, fue publicado un informe en un paciente con carcinoma de vejiga positivo para HPV16 con función disminuida de las células NK y anemia aplásica [93]. En el

mismo año, otro artículo informaba de un paciente trasplantado con tumor vesical en el que fue detectado HPV11 [94]. Se sabe que los HPV infectan al hombre y, aunque la mayoría de estas proliferaciones son benignas, algunos pueden convertirse en malignas dependiendo dicha transformación maligna del tipo de HPV [95], donde podría seguir un modelo similar al observado en carcinoma de cérvix.

Entre los 120 tipos de HPV descubiertos hasta la fecha, alrededor de 40 están involucradas en las infecciones ano-genitales. Los datos epidemiológicos y bioquímicos apoyan la división de los HPV en dos grupos: de alto riesgo, tales como los HPV tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, y 82, capaces de provocar la progresión a cáncer del cuello del útero, y de bajo riesgo, como los HPV tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81, cuya infección rara vez o nunca conduce a cáncer.

El HPV16 es el tipo de HPV más extensamente estudiado y sirve como un importante modelo para el estudio de la carcinogénesis viral. Se sabe que los genes E6 y de E7 de los HPV de alto riesgo desempeñan un papel importante en la carcinogénesis del cuello uterino, porque son altamente expresados en células de carcinoma cervical y tienen la capacidad de transformar e inmortalizar a los queratinocitos primarios. En el proceso de inactivación de los productos de los genes supresores de tumores, la proteína E6 conduce a la degradación de la proteína p53, y el complejo de unión de las proteínas E7 y Rb altera el ciclo normal de las células y conduce a la proliferación celular anormal [96].

Durante una infección común y en la mayoría de las lesiones premalignas el HPV se encuentra en un estado episomal. Sin embargo, la mayoría de los carcinomas de cuello uterino y las líneas celulares derivadas mantienen el genoma del HPV en forma integrada o

en forma integrada y episomal. Así, la integración del genoma viral en los cromosomas de la célula huésped se ha propuesto como un mecanismo de activación para la progresión de las lesiones preinvasoras del cáncer cervical. La integración del genoma del HPV por lo general altera o elimina el ORF del gen E2, o rara vez el de gen E1, que resulta en la pérdida de expresión de los productos génicos correspondientes. La alteración de estos genes también conduce a la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7, ya que los productos del gen E2 reprimen las actividades de los promotores de HPV que dirigen la expresión de los genes E6 y la E7. La alteración del gen E2 en la integración del genoma viral hace imposible la amplificación por PCR de esta secuencia de genes [88, 97, 98].

En el tracto genitourinario, los HPV tipo 6/11 son los más comúnmente asociados con condilomas acuminados genitales [99], mientras que los tipos 16 y 18 están asociados a displasias y carcinomas [100]. En TCC la mayoría de los HPV han sido reportados en un pequeño número de pacientes con un estado de inmunodeficiencia [93, 94], aunque recientemente series más amplias de TCC han sido examinadas demostrando una incidencia variable de ADN de HPV, que oscilaba entre el 2,5% a 62% [101-105]. También fueron reportados resultados negativos [106-107]. La Tabla 1 (página 10) muestra una compilación de la información reflejada en los estudios más relevantes sobre el estudio de la prevalencia de HPV en neoplasias uroteliales de vejiga urinaria.

Además, la detección de ADN de HPV 16/18 por medio de la de hibridación in situ no-isotópica se ha relacionado con una pobre supervivencia [103, 104]. Nuestros resultados muestran una incidencia del 9,2% del ADN de HPV 16 en el TCC. Estas diferencias podrían

explicarse por razones metodológicas [107]. De hecho, el tipo y tiempo de fijación se han considerado parámetros importantes para la preservación de ADN [108, 109]. Sin embargo, el hallazgo presentado aquí refleja una relación significativa entre la detección de ADN de HPV 16 mediante análisis de PCR y una reducción en la supervivencia del paciente, confirmando estudios anteriores sobre la pobre supervivencia de los casos de TCC que presentan ADN de HPV de alto riesgo detectado por el uso en hibridación in situ [103, 104]. En conjunto, estos resultados podrían indicar un valor pronóstico adicional de la infección viral en el cáncer de vejiga, aunque el grado patológico es el único parámetro independiente en la supervivencia del cáncer de vejiga, como es mostrado por nuestros resultados. Esto apoya nuestros resultados en relación con que la mayoría de los pacientes con TCC (71,4%) asociadas con el ADN de HPV16 fueron de alto grado. Estos resultados son de interés ya que el grado patológico sigue siendo un parámetro de pronóstico importante en la supervivencia de los pacientes con TCC de la vejiga urinaria. Por último, encontramos que la coilocitosis es significativa en la supervivencia del paciente, lo que podría estar relacionado con la concomitante incidencia de una creciente coilocitosis con un creciente grado patológico.

La infección por HPV se limita a las células epiteliales y la finalización del ciclo de vida del virus requiere la diferenciación epitelial [96, 110]. Un epitelio escamoso estratificado como el cuello del útero o el urotelio incluye: una capa basal/parabasal, junto a la membrana basal, que es responsable de la reposición de las capas superficiales; la zona media, en la que las células epiteliales maduran y se diferencian; y por último la capa superficial, que comprende el estado final de las células completamente diferenciadas. El HPV infecta las células basales a las que accede ya sea a través de abrasiones o de una juntura. En las células basales, el ADN viral suele mantenerse con un bajo número de copias en un forma episomal

(circular). La replicación viral es dependiente de la maquinaria celular y la transcripción es dependiente de factores de transcripción celular expresados en las células en diferenciación. Dado que las células en diferenciación normalmente abandonan el ciclo celular, un papel clave de la expresión de E6 y E7 es mantener la replicación del ADN activa en estas células que se diferencian, a través de la inactivación de p53 y la proteína retinoblastoma (Rb). El ADN viral se replica hasta un alto número de copias en la zona media y es encapsulado hacia la superficie. La progenie viral se libera de las células superficiales tal como éstas se van desprendiendo, lo que permita comenzar un nuevo ciclo infeccioso sin lisis o destrucción de las células viables. En la mucosa del cuello uterino, la infección por HPV productivo aparece como una neoplasia intraepitelial cervical grado 1 (CIN 1), con los característicos coilocitos. La mayoría de las infecciones por HPV productivas se saldan o eliminan por la inmunidad mediada por células, dando lugar a la regresión del CIN 1 a un epitelio de aspecto normal [111].

La oncogénesis viral puede ser vista como una infección viral abortiva, en la que el virus persiste en su huésped celular y no completa el ciclo de vida normal [112]. Las infecciones que persisten en el tiempo son más propensas a progresar a CIN 2 / 3. Los acontecimientos moleculares que subyacen a la persistencia del HPV y la progresión a CIN 2 / 3 no están completamente entendidos [113]. A pesar de que la degradación mediada por E6/E7 de p53 y Rb permite la replicación viral, también aumenta la inestabilidad genómica. La pérdida de la diferenciación celular afecta a la expresión coordinada de la de proteínas virales. En los cambios de interacción huésped-virus desde la infección viral a la preneoplasia (CIN 2 / 3) y el cáncer, el ADN viral puede integrarse en el genoma de la célula huésped [114], lo que contribuye a la sobreexpresión de E6 y E7. E6 y E7 también interactúan con otras varias

proteínas celulares importantes que afectan a la integridad de las vías principales, como se ha demostrado en varios estudios in vitro. Así, el efecto global de la actividad diana de E6/E7 es la pérdida de la apoptosis y la protección del genoma por p53 y la pérdida del control del ciclo celular por Rb, pero otros numerosos genes supresores tumorales implicados en el control del ciclo celular y la apoptosis también son blanco de E6/E7 y de la metilación. A pesar de ello, la diferencia de tiempo entre la infección inicial y la aparición del cáncer y la relativamente pequeña fracción de las infecciones que derivan en cáncer, sugiere que hay otros factores, como los de medio ambiente o del anfitrión, que contribuyen a la progresión maligna de las lesiones.

La infección por HPV es necesaria pero no suficiente para el desarrollo de lesiones de alto grado, por lo que la alteración celular inducida por agentes exógenos u otros cambios celulares deben ser necesarios para la progresión a la malignidad [115-117].

Recientemente, la búsqueda de cofactores que participen en la vía oncogénica multi-pasos de los tumores epiteliales ha recibido mucho interés. Los agentes de transmisión sexual, particularmente las infecciones virales, han sido postulados para tener un papel sinérgico en la carcinogénesis de las neoplasia epiteliales [120]. Aparte del virus del herpes simple, que ha sido durante mucho tiempo sospechoso de actuar como promotor en el desarrollo del cáncer cervical y cuya asociación con el cáncer de vejiga ha sido publicada [126, 127], otros herpes virus también son candidatos potenciales [120]. Existen numerosos informes de otras posibles asociaciones entre enfermedades y la participación del HHV6. La dificultad de estos estudios radica en la ubicuidad de la infección por HHV6 y su tropismo de tejido generalizado, por lo que la detección de ADN de HHV6 en una condición patológica puede ser una consecuencia de la reactivación del virus por un estado patológico y no la causa

etiología. En general, la explicación biológica de cómo el HHV6 podría contribuir a la patogénesis de la enfermedad falta por esclarecer [124]. Por lo tanto, la baja incidencia de ADN de HHV6B en nuestro estudio es más consistente con un papel de espectador en lugar de un cofactor en la oncogénesis del cáncer de vejiga.

El HHV6 rara vez es hallado en el tracto genitourinario, y nuestro estudio muestra una incidencia baja (6,8%) de ADN de HHV6 asociado a cáncer de vejiga de alto grado y estadio. Esto concuerda con las observaciones en las muestras de cáncer de cuello uterino que muestran una incidencia de 1-10% [43, 118, 119]. El papel del HHV6 en el cáncer de cuello uterino es apoyado por hallazgos tales como que el ADN de HHV6 puede transformar los queratinocitos humanos in vitro y puede acelerar el crecimiento de tumores inducidos por HPV en ratones “nude”, posiblemente mediante el incremento de expresión de las oncoproteínas E6 y E7 del HPV a través de la trans-activación de promotores del HPV [11, 120 -122].

La inmortalización celular inducida por HPV genera una población de células epiteliales susceptibles a otros carcinógenos como el HHV6 [119]. Esto abre una vía para investigar la posible asociación entre el HHV6 y el HPV en el cáncer de vejiga, ya que la hipótesis de trabajo actual es que el HPV es necesario pero no suficiente para el desarrollo de un subconjunto de lesiones pre-malignas y malignas del tracto genitourinario.

El citomegalovirus (CMV), el virus del herpes humano 6 y el 7 (HHV6 y HHV7) son miembros del grupo β -herpesvirus, y se encuentran universalmente en todas las zonas geográficas y grupos socioeconómicos. Dos herpesvirus humanos, el Epstein Barr Virus (EBV) y el virus del

herpes humano 8 (HHV8), han sido identificados como agentes oncogénicos. Ya que las primeras cepas de HHV6 fueron aisladas de pacientes con trastornos linfoproliferativos, ha habido un interés continuo por explorar su posible papel en el cáncer. Este interés se ha fomentado aún más por el descubrimiento de genes del HHV6 que codifican proteínas transactivadoras, una de las cuales ha demostrado poseer capacidad de transformación [43].

Al igual que de otros herpesvirus, ahora se sabe de la ubicuidad del HHV6 por infección primaria durante el primer año de vida. Aunque el virus permanece latente, puede ser activado por factores inmunológicos u otros factores orgánicos. Según una publicación [128], el HHV6 fue encontrado mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) en la secreción vaginal en 3 de 29 mujeres que acudieron a una clínica de enfermedades de transmisión sexual, lo que abre la vía de que el acceso del virus al tracto urogenital puede también ser un cofactor en el proceso que conduce al cáncer cervical y otros. Además, se ha sugerido que la infección por HHV6 puede afectar negativamente al pronóstico y tratamiento de la displasia cervical y el cáncer cervical [128]. Si bien, el HHV6 no tenía ningún efecto sobre el crecimiento de células normales y no convertía las células inmortalizadas por HPV en malignas, la infección del HHV6 en los tumores espontáneos HPV positivos y la inyección subcutánea de células de éstos en células "nude" resultó en una menor latencia de aproximadamente 50% en comparación con el carcinoma de células que contienen sólo el HPV [11].

Sin duda alguna el CMV codifica múltiples proteínas que estimulan el ciclo celular y que, en teoría, podría tener un potencial oncogénico. El análisis de la secuencia y otros datos indican que al menos uno de los ortólogos de esas proteínas de HHV6 y HHV7, la UL97 proteína quinasa ortóloga a U69, es probable que tengan efectos similares. Además, el

citomegalovirus humano codifica numerosas proteínas anti-apoptóticas [139] y se ha demostrado que su infección previene la muerte de algunas células cancerosas [140]. Adicionalmente, algunas proteínas del CMV son mutagénicas [145], lo que puede causar la inestabilidad genómica conduciendo hacia el cáncer a través de un mecanismo de "golpear y correr". Por lo tanto, las múltiples funciones de este tipo de virus podrían contribuir a la oncogénesis. En términos de patogénesis, numerosos estudios han encontrado genoma o proteínas de citomegalovirus humano, HHV6 y HHV7 en las células o tejidos cancerosos [8, 136, 137]. Sin embargo, la naturaleza omnipresente de estos virus implica que los estudios de asociación de este tipo deben ser interpretados con cautela.

En favor del potencial oncogénico para el HHV6 está el hallazgo de la actividad transactivadora y transformadora localizada en la ORF-1 del HHV6, que se une a p53 e inhibe la transcripción activada por p53. Esta actividad, junto con la detección de HHV6 ORF-1 en tejidos malignos, puede indicar un papel de HHV6 ORF-1 en el cáncer humano. Además, las oncoproteínas de HHV6 presentan las mismas características que las oncoproteínas de varios virus de ADN tumorales tales como el antígeno T del SV40 y los poliomavirus, la E1B del adenovirus y la E6 del HPV16, debido a su capacidad para unir e inactivar las proteínas del huésped supresoras de tumores tales como p53. Pero actualmente faltan pruebas in vivo de esta asociación tanto en cánceres de cuello de útero como en vejiga. Sin embargo esto podría explicar la acumulación de p53 observado en nuestro estudio que, si bien esté probablemente relacionado con alto grado y estadio de los tumores más que con el estatus del ADN de HHV6, podría deberse a una inactivación funcional de la proteína p53 por la ORF-1 del HHV6 y a su acumulación nuclear, tal y como ha sido publicado [43, 124, 125].

Varios trabajos han examinado los efectos de la infección por HHV6 en el crecimiento celular. Las células T [142] o las células epiteliales [143] infectadas con el HHV6B, y las células precursoras gliales infectadas con HHV6A ó HHV6B [144], dejan de dividirse, cesa rápidamente la síntesis de ADN celular, y quedan detenidas con un contenido de ADN G1 / S (2n). Si bien los niveles de la proteína supresora de tumores p53 son elevados en las células infectadas por HHV6 [145], los niveles de p21 no son elevados [146], y la detención en G1 / S parece ser independiente de p53. Esta acumulación de p53 en ausencia de una detención del crecimiento p53-dependiente o apoptosis, sugiere que el HHV6 puede inactivar p53 o al menos algunas de las funciones de p53. El mecanismo por el que el HHV6B interfiere con la p53, no está claro, aunque han sido identificadas dos proteínas de unión a p53 codificadas por el virus. En el HHV6A y 6B, la proteína U14 se ha demostrado que se une a p53 [147], y además HHV6A también codifica en el gen DR7 una proteína de unión a p53 [43].

Por otro lado, en G0 y las fases G1 del ciclo celular, la forma activa hipofosforilada de Rb se une a los factores de transcripción de la familia E2F. A través de heterodimerización con las proteínas DP, E2Fs se une a los promotores y controla la transcripción de genes que están involucrados en muchas funciones celulares, como la importante progresión del ciclo celular, la replicación del ADN, la respuesta al daño del ADN, la apoptosis, la diferenciación y el desarrollo, senescencia, y la angiogénesis. La proteína Rb, cuyo gen en sí mismo es dependiente de E2F, se une a E2Fs en estos promotores para reprimir activamente la transcripción mediante el bloqueo del dominio de activación de E2F. Las células deben sintetizar grandes cantidades de ADN para replicar su genoma durante el ciclo de división celular. Tanto las enzimas que sintetizan o metabolizan deoxinucleótidos, así como las que directa o indirectamente facilitan la polimerización de deoxinucleótidos, son necesarias para

la síntesis de ADN. La producción coordinada de estas necesarias enzimas se logra colocándolas bajo el control de los factores de transcripción E2F que a su vez son regulados por Rb. Dado que los virus con genomas de ADN también debe sintetizar cantidades significativas de este ácido nucleico en la replicación durante su ciclo productivo (lítico), muchos han evolucionado para modular la vía de Rb-E2F [138].

Hay varios motivos por los que HHV6 también puede modular la vía de Rb-E2F. En primer lugar, mediante la manipulación de esta vía pueden sincronizar las células infectadas en una posición del ciclo celular que favorezca la replicación eficiente de sus genomas de ADN y, por extensión, de su ciclo productivo (lítico). Tal sincronización parece requerir, tanto de las funciones de estimulación del ciclo celular como de las de detención del mismo. Esta posición favorable del ciclo celular puede considerarse como la fase G1 para todas las clases de virus del herpes. La detención en G1 presumiblemente es beneficiosa ya que la prevención de la replicación del genoma celular permite la utilización sin compromiso de los precursores de ADN y las enzimas de replicación, para la producción exclusiva de genomas virales. Si bien esta hipótesis del supuesto beneficio que la detención del ciclo celular que se observa en las infecciones herpes líticas supone para este tipo de virus se invoca comúnmente (y tiene mucho sentido), sorprendente hay pocas pruebas directas que la apoyen. Se sabe que la replicación del citomegalovirus humano, el más grande y más lento herpesvirus humano, se ve retrasada y disminuida debido a una mutación puntual en IE2 que hace que no se logre detener la progresión del ciclo celular [148]. Sin embargo, no está claro si la incapacidad para detener el ciclo celular es la única deficiencia mostrada por este alelo mutante de esta proteína esencial del citomegalovirus humano. Además, como otros herpes, como el VHS-1 y el EBV, tienen los genomas más pequeños y se replican mucho más

rápido, se podría esperar que la competencia de los nucleótidos tendría un efecto cuantitativamente menor en estos virus. Se necesita más trabajo para determinar por qué G1 parece ser una posición favorable del ciclo celular para el ciclo lítico de los herpes. El segundo motivo por el que el virus de herpes puede modular la vía del Rb-E2F es para facilitar la división celular y por lo tanto la ampliación de la reserva de células con infección latente. Aunque la replicación lítica puede aumentar rápidamente el número de células infectadas dentro del huésped, y la progenie de viriones generada puede mediar en la transmisión a nuevos huéspedes, las células infectadas líticamente son de corta duración y están expuestas a las defensas inmunitarias intrínsecas. La latencia permite la persistencia a largo plazo de las células infectadas que pueden ser menos visibles para el sistema inmunológico. Si las células latentemente infectadas proliferan, o pueden ser inducidos a proliferar, el depósito de tales células podría ser ampliado. Así, tanto las infecciones líticas como las latentes del virus de herpes posiblemente podrían beneficiarse de la modulación del ciclo celular del huésped en general y de la vía de Rb-E2F en particular.

Por otra parte, el HHV6 puede aumentar la expresión del genoma del HPV en las células tumorales y células inmortalizadas. El análisis densiométrico de ensayos por Northern blots indicó que el ARN de HPV16 en cultivos coinfectados se incrementó de dos a tres veces, y la extrapolación considerando el número de células que expresaban realmente el HHV6 podría indicar que la expresión del HPV en realidad aumentó aproximadamente 20 veces. El incremento de las transcripciones en el HPV apoya la hipótesis de que el HHV6 puede estar implicado en la progresión de la carcinogénesis de múltiples fases que conducen al cáncer, posiblemente, mediante la regulación de la expresión de los genes inmortalizadores E6 y E7 del HPV [121]. El análisis del ADN de carcinomas de cuello uterino para detectar la presencia

del HHV6 y HPV mediante PCR y análisis de Southern Blot de mostró que los dos virus se encuentran juntos sólo en casos raros, mientras que las secuencias de HPV se encuentran en aproximadamente el 60% de las mujeres. Para eliminar la posibilidad de que se estuviera examinando el ADN de linfocitos, cortes histopatológicas de los carcinomas de cuello uterino fueron analizados por hibridaciones in situ con sondas específicas del HHV6. La confirmación concluyó que el HHV6 se encontraba en los núcleos en algunas de las células del tumor epitelial de cuatro de los seis pacientes en los que hubo tejido suficiente para las muestras [129]. Sin embargo, el HHV6 y HPV de alto riesgo (como el HPV 16) sólo se han detectado juntos en casos raros de cáncer de cuello uterino: por ejemplo, secuencias de ADN de HHV6 fueron encontrados en sólo 6 de 72 casos de carcinoma epidermoide de cuello uterino y neoplasia intraepitelial cervical; de estos seis casos, el HPV16 fue encontrado en cuatro. El HHV6 no se encontró en el ADN de 30 mujeres normales o en pacientes con cervicitis [130]. Otros dos grupos han estudiado la prevalencia de HHV6 (y HHV7) en el tracto genital de la mujer [128, 131]. Leach et al. encontraron HHV6 en el 10% de las muestras vaginales de mujeres que acudieron a las clínicas Genito-Urinary Medicine (GUM) [128], mientras que Okuno et al. encontraron HHV6 (la variante B solamente) en el 19,4% de los frotis cervicales de 72 mujeres embarazadas en comparación con 34 controles de no embarazadas. Además, el 1% de las mujeres con citologías anormales fueron positivas para HHV6 [132-134]. En otro estudio realizado en Wessex, Reino Unido, el HHV6 fue detectado en 18% de las muestras examinadas [135].

Ninguno de los casos investigados en el presente estudio tenía HHV6A. Se cree que la mayoría de las infecciones clínicas en los huéspedes inmuno-competentes son infecciones de HHV6B y que el HHV6A contribuye a las infecciones en huéspedes inmuno-

comprometidos y algunas manifestaciones neurológicas [18]. La identidad en general de la secuencia de nucleótidos entre las variantes A y B del HHV6 es del 90%, disminuyendo desde un 95-98% en la región central más conservada hacia los extremos del genoma, alcanzando sólo un 31% en la región IE-1. El HHV6A y HHV6B tienen perfiles característicos para las endonucleasas de restricción que permiten su clasificación clínica sin ambigüedades como variante A o B. Los patrones de splicing y la regulación temporal de la transcripción de la región IE-1 difieren entre las variantes A y B, lo que sugiere que esta región puede ser responsable de ciertas diferencias biológicas entre las dos variantes [16].

CONCLUSIONES

1. La detección de antígeno de la cápside (HPVcAg) de HPV mediante técnica inmunohistoquímica para establecer la infección por HPV en las neoplasias vesicales sobrestima el número de casos positivos al compararse con un método de detección molecular para determinar la presencia del ADN del virus tal como la hibridación in situ.
2. La presencia de ADN de HPV16 determinada mediante PCR resultó estadísticamente significativa ($P=0,0418$) en la supervivencia del carcinoma urotelial de vejiga en nuestra serie, mediante análisis univariado.
3. Otros parámetros igualmente significativos en la supervivencia del carcinoma urotelial de vejiga mediante análisis univariado fueron el grado ($P<0,0001$), el estadio ($P<0,0001$) y la presencia histológica de coilocitosis ($P<0,0140$).
4. Sin embargo, en nuestra serie el único parámetro independiente en relación a la supervivencia del carcinoma urotelial de vejiga fue el grado histológico ($P<0,0001$).
5. En relación con la presencia de ADN de Herpesvirus tipo 6, nuestro estudio demostró tan solo la presencia de la variante B, en 5 (6,8 %) de los 74 casos investigados. Dos de estos pacientes presentaron coinfección con ADN de HPV16.
6. La baja incidencia de coinfección de ADN de HHV6 y HPV en nuestra serie en carcinoma urotelial, sugiere que el papel de HHV6 en la oncogénesis del cáncer de vejiga sea más de testigo accidental que de cofactor relevante.

BIBLIOGRAFIA

1. Aaltonen LM, Cajanus S, Back L, Nieminen P, Paavonen J, Ranki A. Extralaryngeal HPV infections in male patients with adult-onset laryngeal papillomatosis. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol* 2005; 262: 708–712.
2. Baillargeon, J, J Piper, and CT Leach. Epidemiology of human herpesvirus 6 (HHV-6) infection in pregnant and nonpregnant women. *J. Clin. Virol.* 2000; 16:149–157.
3. Biberfeld P, B Kramarsky, SZ Salahuddin, and RC Gallo. Ultrastructural characterization of a new human B lymphotropic DNA virus (human herpesvirus 6) isolated from patients with lymphoproliferative disease. *J. Natl. Cancer Inst.* 1987; 79:933–941.
4. Bosch FX, Durst M, Schwarz E, Boukamp P, Fusenig NE, zur Hausen H. The early genes E6 and E7 of cancer associated human papilloma viruses as targets of tumor suppression? *Behring Inst. Mitt* 1991; 89:108–121.
5. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55:244–65.
6. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El GF, *et al.*: A review of human carcinogens – Part B: biological agents. *Lancet Oncol* 2009; 10:321-322
7. Brink, A. A., P. J. Snijders, and C. J. Meijer. HPV detection methods. *Dis. Markers* 2007; 23:273–281.
8. Caselli E, Di Luca D: Molecular biology and clinical associations of Roseoloviruses human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7. *New Microbiol* 2007; 30:173-187.

9. Cates W Jr, Dallabetta G. The staying power of sexually transmitted diseases. *Lancet* 1999; 354 (Suppl SIV62).
10. Cheah PL, Looi LM. Biology and pathological associations of the human papillomaviruses: A review. *Malays. J. Pathol* 1998; 20:1–10.
11. Chen MC, Popescu NC, Woodworth CD, Berneman Z, Corbellino M, Lusso P, Ablashi DV, DiPaolo JA: Human herpesvirus-6 infects epithelial cells and transactivates human papillomavirus gene expression. *J Virol* 1994; 68:1173-1178
12. Chow LT, Broker TR. Papillomavirus DNA replication. *Intervirology* 1994; 37:150–158.
13. Clarke J, Terry RM, Lacey CJ. A study to estimate the prevalence of upper respiratory tract papillomatosis in patients with genital warts. *Int. J. STD AIDS* 1991; 2:114–115.
14. Clertant P, Seif I. A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins? *Nature* 1984; 311:276–279.
15. Crum CP, Ikenberg H, Richart RM, Gissman L. Human papillomavirus type 16 and early cervical neoplasia. *N Engl J Med* 1984; 310:880–3.
16. De Bolle L, Naesens L, De Clercq E: Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:217-245.
17. de Villiers EM, Weidauer H, Le JY, Neumann C, zur Hausen H. (Papilloma viruses in benign and malignant tumors of the mouth and upper respiratory tract). *Laryngol. Rhinol. Otol. (Stuttg)* 1986; 65 :177–179.
18. Dewhurst, S., K. McIntyre, K. Schnabel, and C. B. Hall. Human herpesvirus 6 (HHV-6) variant B accounts for the majority of symptomatic primary HHV-6 infections in a population of U.S. infants. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:416–418.

19. Dominguez, G., T. R. Dambaugh, F. R. Stamey, S. Dewhurst, N. Inoue, and P. E. Pellett.. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J. Virol.* 1999; 73:8040–8052.
20. Doorbar, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin. Sci.* 2006; 110:525–541.
21. Duensing S, Duensing A, Crum CP, Munger K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res* 2001; 61:2356–60.
22. Duensing S, Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res* 2002; 62:7075–82.
23. Durst M, Croce CM, Gissmann L, Schwarz E, Huebner K. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84:1070–1074.
24. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983; 80:3812–3815.
25. El-Mofty SK, Lu DW. Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA in squamous cell carcinoma of the palatine tonsil, and not the oral cavity, in young patients: A distinct clinicopathologic and molecular disease entity. *Am. J. Surg. Pathol* 2003; 27:1463–1470.
26. Ensoli, B., P. Lusso, F. Schachter, S. F. Josephs, J. Rappaport, F. Negro, R. C. Gallo, and

- F. Wong-Staal. Human herpes virus-6 increases HIV-1 expression in co-infected T cells via nuclear factors binding to the HIV-1 enhancer. *EMBO J.* 1989; 8:3019–3027.
27. Filippova M, Brown-Bryan TA, Casiano CA, Duerksen-Hughes PJ. The human papillomavirus 16 E6 protein can either protect or further sensitize cells to TNF: effect of dose. *Cell Death Differ.* 2005; 12:1622-35.
28. Finzer P, Aguilar-Lemarroy A, Rosl F. The role of human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis. *Cancer Lett* 2002; 188:15–24.
29. Flores ER, Lambert PF. Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *J. Virol* 1997; 71:7167–7179.
30. Frattini MG, Laimins LA. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91:12398–12402.
31. Ganguly N, Parihar SP. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci* 2009; 34:113-23.
32. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J. Natl. Cancer Inst* 2000; 92:709–720.
33. Gissmann L, Boshart M, Durst M, Ikenberg H, Wagner D, zur Hausen H. Presence of human papillomavirus in genital tumors. *J. Invest. Dermatol* 1984; 83:26S–28S.
34. Gompels, U. A., J. Nicholas, G. Lawrence, M. Jones, B. J. Thomson, M. E. Martin, S. Efsthathiou, M. Craxton, and H. A. Macaulay. The DNA sequence of human

- herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology* 1995; 209:29–51.
35. Hall, C. B., C. E. Long, K. C. Schnabel, M. T. Caserta, K. M. McIntyre, M. A. Costanzo, A. Knott, S. Dewhurst, R. A. Insel, and L. G. Epstein. Human herpesvirus-6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N. Engl. J. Med.* 1994; 331:432–438.
36. Ho, G. Y., Y. Y. Studentsov, R. Bierman, and R. D. Burk. Natural history of human papillomavirus type 16 virus-like particle antibodies in young women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2004; 13:110–116.
37. Hoffmann R, Hirt B, Bechtold V, Beard P, Raj K. Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance. *J. Virol* 2006; 80:4431–4439.
38. Howley PM, Munger K, Werness BA, Phelps WC, Schlegel R. Molecular mechanisms of transformation by the human papillomaviruses. *Princess Takamatsu Symp* 1989; 20:199–206.
39. Howley, PM. *Virology*. 2nd edn. Lippincott-Raven Publishers; Philadelphia, PA: 1996. Papillomavirinae: The viruses and their replication; p. 2045-2076.
40. Ihira, M., T. Yoshikawa, J. Ishii, M. Nomura, H. Hishida, M. Ohashi, Y. Enomoto, S. Suga, K. Iida, Y. Saito, Y. Nishiyama, and Y. Asano. Serological examination of human herpesvirus 6 and 7 in patients with coronary artery disease. *J. Med. Virol.* 2002; 67:534–537.
41. Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. Integration of human papilloma-virus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J. Virol*

1995; 69:2989–2997.

42. Kao, W. H., S. L. Beaudenon, A. L. Talis, J. M. Huibregtse, and P. M. Howley. Human papillomavirus type 16 E6 induces self-ubiquitination of the E6AP ubiquitin-protein ligase. *J. Virol.* 2000; 74:6408–6417.
43. Kashanchi, F., J. Araujo, J. Doniger, S. Muralidhar, R. Hoch, S. Khleif, E. Mendelson, J. Thompson, N. Azumi, J. N. Brady, M. Luppi, G. Torelli, and L. J. Rosenthal. Human herpesvirus 6 (HHV-6) ORF-1 transactivating gene exhibits malignant transforming activity and its protein binds to p53. *Oncogene* 1997; 14:359–367.
44. Kashanchi, F., J. Thompson, M. R. Sadaie, J. Doniger, J. Duvall, J. N. Brady, and L. J. Rosenthal. Transcriptional activation of minimal HIV-1 promoter by ORF-1 protein expressed from the Sall-L fragment of human herpesvirus 6. *Virology* 1994; 201:95–106.
45. Klingelutz, A. J., S. A. Foster, and J. K. McDougall. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 1996; 380:79–82.
46. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus D. infection. *Am. J. Med* 1997; 102:3–8.
47. Kuo SR, Liu JS, Broker TR, Chow LT. Cell-free replication of the human papillomavirus DNA with homologous viral E1 and E2 proteins and human cell extracts. *J. Biol. Chem* 1994; 269:24058–24065.
48. Londesborough P, Ho L, Terry G, Cuzick J, Wheeler C, Singer A. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int. J. Cancer* 1996; 69:364–368.

49. Lopez Amado M, Castro Lareo I, LozanoRamirez A, Caballero Torcuato L. Epidemiology of otorhinolaryngological squamous cell papillomas in a Spanish subpopulation during a 20 year period. *Rev. Laryngol. Otol. Rhinol. (Bord)* 1996; 117:105–110.
50. Manos, M. M., T. Ting, D. K. Wright, A. J. Levwis, T. R. Brer, and D. K. Wolinsky. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989; 7:209–214.
51. Mansky KC, Batiza A, Lambert PF. Bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen share regions of sequence similarity required for multiple functions. *J. Virol* 1997; 71:7600–7608.
52. Milde-Langosch KM, Loning T, Meichsner M, Henke RP. HPV infections in tumors of the upper respiratory and digestive tract. In situ hybridization and dot-blot hybridization with biotinylated DNA probes). *Acta Histochem. Suppl* 1989; 37:103–108.
53. Mineta H, Ogino T, Amano HM, Ohkawa Y, Araki K, Takebayashi S, Miura K. Human papilloma virus (HPV) type 16 and 18 detected in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 1998; 18: 4765–4768.
54. Mocarski ES: Comparative analysis of herpesvirus-common proteins. In *Human Herpesviruses* New York: Cambridge University Press; 2007:44-58.
55. Mori Y, Yamanishi K: HHV-6A, 6B, and 7: pathogenesis, host response, and clinical disease. In *Human Herpesviruses* New York: Cambridge University Press; 2007:833-842.

56. Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol* 1989; 63:4417–4421.
57. Nakano K. Characteristics of human papillomavirus (HPV) infection in papilloma of the head and neck —detection of HPV according to clinical features and type specificity in the head and neck. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 1994; 97:1381–1392.
58. Newton R, Ziegler J, Ateenyi-Agaba C, Bousarghin L, Casabonne D, Beral V, Mbidde E, Carpenter L, Reeves G, Parkin DM, Wabinga H, Mbulaiteye S, et al. The epidemiology of conjunctival squamous cell carcinoma in Uganda. *Br. J. Cancer* 2002; 87:301–308.
59. Nicholas, J., and M. E. Martin. Nucleotide sequence analysis of a 38.5-kilobase-pair region of the genome of human herpesvirus 6 encoding human cytomegalovirus immediate-early gene homologs and transactivating functions. *J. Virol.* 1994; 68:597–610.
60. O'Connor DP, Bennett MA, Murphy GM, Leader MB, Kay EW. Do human papillomavirus cause cancer? *Curr Diagn Pathol* 1996: 123-5.
61. Okuno, T., K. Takahashi, K. Balachandra, K. Shiraki, K. Yamanishi, M. Takahashi, and K. Baba. Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27:651–653.
62. Parker, C. A., and J. M. Weber. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG and IgM antibodies to human herpesvirus type 6. *J. Virol. Methods* 1993; 41:265–275.
63. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*

2005; 55:74– 108.

64. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 2006; 118:3030–44.
65. Sakai H, Yasugi T, Benson JD, Dowhanick JJ, Howley PM. Targeted mutagenesis of the human papillomavirus type 16 E2 transactivation domain reveals separable transcriptional activation and DNA replication functions. *J. Virol* 1996; 70:1602–1611.
66. Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine, and P. M. Howley. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63:1129–1136.
67. Schirmer, E. C., L. S. Wyatt, K. Yamanishi, W. J. Rodriguez, and N. Frenkel. Differentiation between two distinct classes of viruses now classified as human herpesvirus 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88:5922–5926.
68. Schmitt, M., B. Dondog, T. Waterboer, and M. Pawlita. Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5_ and GP6_ primers. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46:1050-9.
69. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985; 314 :111–114.
70. Sedman J, Stenlund A. Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus *in vivo* and *in vitro*. *EMBO J* 1995; 14:6218–6228.
71. Seif I. Sequence homology between the large tumor antigen of polyoma viruses and

- the putative E1 protein of papilloma viruses. *Virology* 1984; 138:347–352.
72. Shaw, KV.; Howley, PM. Papillomavirinae: The viruses and their replication. In: Knipe, DM.; Howley, PM.; Griffin, DE.; Lamb, RA.; Martin, MA., editors. *Fields Virology*. 4th edn.. Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, PA: 2001.
73. Sinclair KA, Woods CR, Kirse DJ, Sinal SH. Anogenital and respiratory tract human papillomavirus infections among children: Age, gender, and potential transmission through sexual abuse. *Pediatrics* 2005; 116:815–825.
74. Stasiak, P. C., and E. S. Mocarski. Transactivation of the cytomegalovirus ICP36 gene promoter requires the alpha gene product TRS1 in addition to IE1 and IE2. *J. Virol.* 1992; 66:1050–1058.
75. Sur M, Cooper K, Allard U. Investigation of human papillomavirus in transitional cell carcinomas of the urinary bladder in South Africa. *Pathology* 2001; 33:17–20.
76. Syrjanen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J. Clin. Virol* 2005; 32:S59– S66.
77. Syrjanen S. Human papillomavirus infections and oral tumors. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 2003; 192:123–128.
78. van Doorn, L. J., W. Quint, B. Kleter, A. Molijn, B. Colau, M. T. Martin, Kravang-In, N. Torrez-Martinez, C. L. Peyton, and C. M. Wheeler. Genotyping of human papillomavirus in liquid cytology cervical specimens by the PGMV line blot assay and the SPF (10) line probe assay. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40:979–983.
79. Veldman, T., I. Horikawa, J. C. Barrett, and R. Schlegel. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J. Virol.*

2001; 75:4467–4472.

80. Waddell KM, Lewallen S, Lucas SB, Atenyi-Agaba C, Herrington CS, Liomba G. Carcinoma of the conjunctiva and HIV infection in Uganda and Malawi. *Br. J. Ophthalmol* 1996; 80(6):503–508.
81. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol* 1999; 189:12–19.
82. White AE, Livanos EM, Tlsty TD. Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev* 1994; 8:666–77.
83. Yee C, Krishnan-Hewlett I, Baker CC, Schlegel R, Howley PM. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am. J. Pathol* 1985; 119:361–366.
84. Yoshpe NS. Oral and laryngeal papilloma: A pediatric manifestation of sexually transmitted disease? *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol* 1995; 31:77–83.
85. zur Hausen H, de Villiers EM, Gissmann L. Papillomavirus infections and human genital cancer. *Gynecol. Oncol* 1981; 12:124–128.
86. zur Hausen H, Gissmann L, Steiner W, Dippold W, Dreger I. Human papilloma viruses and cancer. *Bibl. Haematol* 1975; (43):569–571.
87. zur Hausen H. Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288:55–78.
88. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early

- events in carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst* 2000; 92:690–698.
89. zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. *Proc. Assoc. Am. Physic* 1999; 111:581–587.
90. zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Current Science* 2001; 81:523–27.
91. Lopez-Beltran A, Croghan GA, Croghan I, Matilla A and Gaeta JE. Prognostic factors in bladder cancer. A pathologic, immunohistochemical, and DNA flow-cytometric study. *Am. J. Clin. Pathol.* 1994; 102, 109-114.
92. Lopez-Beltran A, Croghan GA, Croghan I, Huben RP, Mettlin C and Gaetajf. Prognostic factors in survival of bladder cancer. *Cancer* 1992: 70, 799-807.
93. Kitamura T, Yogo Y, Ueki T, Murakami S, Aso Y: Presence of human papillomavirus type 16 genome in bladder carcinoma in situ of a patient with mild immunodeficiency. *Cancer Res.* 1988, 48:7207.
94. Querci della Rovere G, Oliver RT, McCance DJ, Castro JE: Development of bladder tumour containing HPV type 11 DNA after renal transplantation. *Br J Urol.* 1988, 62:36-38.
95. Howley PM. (). Role of human papillomavirus in human cancer. *Cancer Res.* 1991; 51, 5019-5022.
96. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2:342–350.
97. Schmidt MT, Olejnik AK, Goździcka-Józefiak A. The HPV16 E2 transcriptional regulator mode of action dependson the physical state of the viral genome. *Acta Biochim Polon* 2005; 52: 823–832.

98. Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses. In *Filds virology*. Knipe DM, Howley PM, eds, pp 2299. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business, Philadelphia. 2007
99. Del Mistro A, Koss LG, Braunstein J, Bennett B, Sacocomano and Simons KM. Condylomata acuminata of the urinary bladder. Natural history, viral typing and DNA content. *Am. J. Surg. Pathol.* 1988; 12, 205-215.
100. Chang F. Role of papillomavirus. *J. Clin. Pathol.* 1990; 43,269-276.
101. Anwar K, Naiki H, Nakakuki K, and Inuzuka M. High frequency of human papillomavirus infection in carcinoma of the urinary bladder. *Cancer.* 1992; 70, 1967-1973.
102. Chetsanga C, Malmstrom PU, Gyllensten D, Moreno Lopez J, Dinter Z and Pettersonu. Low incidence of human papillomavirus type 16 DNA in bladder tumour detected by polymerase chain reaction. *Cancer.* 1992; 69, 1208-1211.
103. Lopez Beltran A, Carrasco JC, Reymundo C, Morales-Jimenez C, Toro-Rojas M and Santamaria-Ossorion M. (1992). Bladder cancer survival and human papillomavirus infection. Immunohistochemistry and in situ hybridization. In *Oncogenes and Molecular Genetics of Urological Tumours*, Olsson, CA (ed.) pp. 83-89. Churchill Livingstone: Edinburgh.
104. Furihata M, Inque K, Ohtsuki Y, Hashimoto H, Terao N and Fujita Y. (). High-risk human papillomavirus infections and overexpression of p53 proteín as prognostic indicators in transitiollal cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer Res.* 1993; 53, 4823-4827.
105. Lopez-Beltran A and Muñoz E. Transitional cell carcinoma of the bladder: Low

- incidence of human papillomavirus DNA detected by the polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Histopathology*. 1995; 26, 565-571
106. Chang F, Lipponen P, Tervahauta A, Syrjanen S and Syrjanen K. Transitional cell carcinoma of the bladder: failure to demonstrate human papillomavirus deoxyribonucleic acid by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *J. Urol*. 1994; 152, 1429- 1433.
 107. Ashfaq R and Vuitch F. Human papillomavirus and carcinomas of the female urethra. *J. Urol. Pathol*. 1994; 2, 195-201.
 108. Greer CE, Lund JK and Manos M. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: Recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR Methods and Applications*. 1991; 1, 46-48.
 109. Karlsen F, Kalantari M, Chitemerere M, Johansson B and Harmar B. (). Modification of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation. *Lab. Invest*, 1994; 71, 604-611.
 110. Stubenrauch F, Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol*. 1999; 9: 379-386.
 111. Martin A. Whiteside, Erin M. Siegel, Elizabeth R. Unger. Human Papillomavirus and Molecular Considerations for Cancer Risk. *Cancer*. 2008; 113:2981-94.
 112. Middleton K, Peh W, Southern S, et al. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol*. 2003; 77:10186-10201.
 113. Wang SS, Hildesheim A. Chapter 5: viral and host factors in human papillomavirus

- persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003:35-40.
114. Badaracco G, Venuti A, Sedati A, Marcante ML. HPV16 and HPV18 in genital tumors: significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J Med Virol.* 2002; 67:574-582.
 115. Di Paolo, J.A. et al. *Crit. Rev. Oncol.* 1993; 4:337-360.
 116. zur Hausen, H. *Cancer Res.* 1989; 49, 4677-4681.
 117. Ablashi DV, Bernbaum J, DiPaolo JA. Human Herpesvirus 6 as a potential copathogen *Trends Microbiol.* 1995; 3:324-7.
 118. Romano N., Romano F.M., Viviano E., Vitale F., Villafrate M.R., Perna A.M., et al. Rare association of human herpesvirus 6 DNA with human papillomavirus DNA in cervical smears of women with normal and abnormal cytologies, *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34:1589–1591.
 119. Tran-Thanh D., Koushik A., Provencher D., Drouin P., Dubuc-Lissoir J., Gauthier P., et al., Detection of human herpes virus type 6 DNA in precancerous lesions of the uterine cervix, *J. Med. Virol.* 2002;68: 606–610.
 120. Chan P.K., Chan M.Y., Li W.W., Chan D.P., Cheung J.L., Cheng A.F. Association of human beta-herpesviruses with the development of cervical cancer: bystanders or cofactors, *J. Clin. Pathol.* 2001; 54:48–53.
 121. Chen M., Wang H., Woodworth C.D., Lusso P., Berneman Z., Kingma D., et al. Detection of human herpesvirus 6 and human papillomavirus 16 in cervical carcinoma, *Am. J. Pathol.* 1994; 145:1509–1516.
 122. Yoshikawa T., Goshima F., Akimoto S., Ozaki T., Iwasaki T., Kurata T., et al. Human

- herpesvirus 6 infection of human epidermal cell line: pathogenesis of skin manifestations, *J. Med. Virol.* 2003;71: 62–68.
123. Lopez-Beltran A., Escudero A.L., Vicioso L., Munoz E., Carrasco J.C. Human papillomavirus DNA as a factor determining the survival of bladder cancer patients. *Br.J. Cancer* 1996; 73:124–127.
124. Dockrell D.H. Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features, *J. Med. Microbiol.* 2003; 52:5–18.
125. Doniger J., Muralidhar S., Rosenthal L.J. Human cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transactivate, *Clin. Microbiol. Rev.* 1999;12: 367–382.
126. Gazzaniga P., Vercillo R., Gradilone A., Silvestri I., Gandini O., Napolitano M., et al. Prevalence of papillomavirus, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and herpes simplex virus type 2 in urinary bladder cancer, *J. Med. Virol.* 1998;55: 262–267.
127. Kaku N., Kashima K., Daa T., Nakayama I., Yokoyama S. Herpes simplex infection in urothelial carcinoma, *Virch. Arch.* 2004; 445: 68–73.
128. Leach C.T., Newton E.R., McParlin S. and Jenson H.B. Human herpesvirus 6 infection of the female genital tract. *J. Infect. Dis.* 1994; 169: 1281-1283.
129. DiPaolo JA, Popescu NC, Woodworth CD, Zimonjic DB. Papillomaviruses and potential copathogens *Toxicol Lett.* 1996; 88:1-7.
130. Inoue N, Dambaugh TR, Pellett PE. Molecular biology of human herpesviruses 6A and 6B. *Infect. Agents Dis.* 1994; 29:343-360
131. Okuno T, Sao H, Asada H, Shiraki K, Takahashi M and Yamanishi K. Analysis of a

- glycoprotein of human herpesvirus 6 (HHV-6) using monoclonal antibodies. *Virology* 1990; 176: 625-628.
132. Shiraki K, Mukai T, Okuno T, Yamanishi K and Takahashi M. Physicochemical characterization of human herpesvirus 6 infectivity. *J Gen Virol* 1991; 72:169-172.
133. Okuno T, Shao H, Asada H, Shiraki K, Takahashi M and Yamanishi K. Analysis of human herpesvirus 6 glycoproteins recognized by monoclonal antibody OHV1. *J Gen Virol* 1992; 73:443-447.
134. Kurata T, Iwasaki T, Sata T, Wakabayashi T, Yamaguchi K, Okuno T, Yamanishi K and Takei Y. Viral pathology of human herpesvirus 6 infection. *Adv Exp Med Biol* 1990; 278:39-47.
135. Al-Daraji WI, Smith JH. Infection and Cervical Neoplasia: Facts and Fiction *Int J Clin Exp Pathol.* 2009; 2:48-64.
136. Black JB, Pellett PE: Human herpesvirus 7. *Rev Med Virol* 1999; 9:245-262.
137. Soderberg-Naucler C: Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *J Intern Med* 2006; 259:219-246.
138. Hume AJ, Kalejta RF. Regulation of the retinoblastoma proteins by the human herpesviruses. *Cell Div.* 2009; 4:1.
139. Goldmacher VS: Cell death suppression by cytomegaloviruses. *Apoptosis* 2005; 10:251-265.
140. Michaelis M, Kotchetkov R, Vogel JU, Doerr HW, Cinatl J Jr: Cytomegalovirus infection blocks apoptosis in cancer cells. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61:1307-1316.

141. Shen Y, Zhu H, Shenk T: Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate "hit-and-run" oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:3341-3345.
142. Oster B, Bundgaard B, Hollberg P: Human herpesvirus 6B induces cell cycle arrest concomitant with p53 phosphorylation and accumulation in T cells. *J Virol* 2005; 79:1961-1965.
143. Oster B, Kaspersen MD, Kofod-Olsen E, Bundgaard B, Hollberg P: Human herpesvirus 6B inhibits cell proliferation by a p53- independent pathway. *J Clin Virol* 2006; 37:63-68.
144. Dietrich J, Blumberg BM, Roshal M, Baker JV, Hurley SD, Mayer-Proschel M, Mock DJ: Infection with an endemic human herpesvirus disrupts critical glial precursor cell properties. *J Neurosci* 2004; 24:4875-4883.
145. Oster B, Kofod-Olsen E, Bundgaard B, Hollberg P: Restriction of human herpesvirus 6B replication by p53. *J Gen Virol* 2008; 89:1106-1113.
146. De Bolle L, Hatse S, Verbeken E, De Clercq E, Naesens L: Human herpesvirus 6 infection arrests cord blood mononuclear cells in G(2) phase of the cell cycle. *FEBS Lett* 2004; 560:25-29.
147. Takemoto, M., Koike, M., Mori, Y., Yonemoto, S., Sasamoto, Y., Kondo, K., Uchiyama, Y. & Yamanishi, K. Human herpesvirus 6 open reading frame U14 protein and cellular p53 interact with each other and are contained in the virion. *J Virol* 2005; 79: 13037–13046.
148. Petrik DT, Schmitt KP, Stinski MF: Inhibition of cellular DNA synthesis by the

- human cytomegalovirus IE86 protein is necessary for efficient virus replication. *J Virol* 2006; 80:3872-3883.
149. Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006; 57: 43–66.
150. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M et al. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 2005; 66: 4–34.
151. Lopez-Beltran A, Montironi R. Non-invasive urothelial neoplasms: according to the most recent WHO classification. *Eur Urol* 2004; 46: 170–6.
152. Lopez-Beltran A, Sauter G, Gasser T et al. Urothelial tumors: infiltrating urothelial carcinoma. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I, eds. *World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs*. Lyon: IARC Press, 2004.
153. Cheng L, Pan CX, Yang XJ et al. Small cell carcinoma of the urinary bladder: a clinicopathologic analysis of 64 patients. *Cancer* 2004; 101: 957–62.
154. Eble JN, Young RH. Carcinoma of the urinary bladder: a review of its diverse morphology. *Semin Diagn Pathol* 1997; 14: 98–108.
155. Fong A, Garcia E, Gwynn L et al. Expression of caveolin-1 and caveolin- 2 in urothelial carcinoma of the urinary bladder correlates with tumor grade and squamous differentiation. *Am J Clin Pathol* 2003; 120: 93–100.
156. Fossa S. Rare and unusual tumors of the genitourinary tract. *Curr Opin Oncol* 1992; 4: 463–8.
157. Kitamura T, Yogo Y, Veki T, Murakami S and Aso Y. The presence of human

- papillomavirus type 16 genome in bladder carcinoma in situ of a patient with mild immunodeficiency. *Cancer Res.*, 1988; 48: 7207-7211.
158. Querci Della Rovere G, Oliver RTD, McMance DJ and Castro JE. Development of bladder tumour containing HPV type 11 DNA after renal transplantation. *Br. J. Urol.* 1988; 62: 36-38.
159. Bryant P, Davis P and Wison D. Detection of human papillomavirus DNA in cancer of the urinary bladder by in situ hybridization. *Br. J. Urol.* 1991; 68: 49-52.
160. Anwar K, Naiki H, Nakakuki K, and Inuzuka M. High frequency of human papillomavirus infection in carcinoma of the urinary bladder. *Cancer.* 1992; 70, 1967-1973.
161. Chetsanga C, Malmstrom PU, Gyllensten D, Moreno Lopez J, Dinter Z and Pettersonu. Low incidence of human papillomavirus type 16 DNA in bladder tumour detected by polymerase chain reaction. *Cancer.* 1992; 69, 1208-1211.
162. Furihata M, Inque K, Ohtsuki Y, Hashimoto H, Terao N and Fujita Y. (). High-risk human papillomavirus infections and overexpression of p53 protein as prognostic indicators in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer Res.* 1993; 53, 4823-4827.
163. Salztein DR, Orihuela E, Kocurek JN, Payne DA, Chan TS and Tying SK. Failure of the polymerase chain reaction (PCR) to detect human papillomavirus (HPV) in transitional cell carcinoma of the bladder. *Anticancer Res.* 1993; 13: 423-425.
164. Wilczynski SP, Oft M, Cook N, Liao SY and Iftner T. Human papillomavirus type 6 in squamous cell carcinoma of the bladder and cervix. *Hum. Pathol.* 1993;24: 96-102.

165. Ashfaq R and Vuitch F. Human papillomavirus and carcinomas of the female urethra. *J. Urol. Pathol.* 1994; 2, 195-201.
166. Chang F, Lipponen P, Tervahauta A, Syrjanen S and Syrjanen K. Transitional cell carcinoma of the bladder: failure to demonstrate human papillomavirus deoxyribonucleic acid by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *J. Urol.* 1994; 152, 1429- 1433.
167. Kerley SW, Persons DL, Fishback JL. Human papillomavirus and carcinoma of urinary bladder. *Mod Pathol* 1991; 4: 316-19.
168. Knowles MA. Human papillomavirus sequence era not detectable by Southern blotting general primer-mediated polymerase chain reaction in transitional cell tumours of the bladder. *Urol Res* 1992; 20:297-301.
169. Shibutani YF, Schoenberg MP, Carpinello VL, Mally TR. Human papillomavirus associated with bladder cancer. *Urology* 1992; 40:15-17.
170. Song-ting Y, Ming-ming W, Li-ming L. Prevalence of human papillomavirus 16 y 18 in transitional cell carcinoma of bladder. *Chinese Med J* 1993; 106:494-6.
171. Aglinao AM, Gradilone A, Gazzaniga P, Napolitano M, Vercillo R, Albonici L, Naso G, Manzari V, Frati L, Vecchione A. High frequency of human papillomavirids detection in urinary bladder cancer. *Urol Int* 1994; 53:125-9.
172. Maloney KE, Wiener JS, Walther PJ. Oncogenic human papillomavirus are rarely associated with squamous cell carcinoma of the bladder: evaluation by differential polymerase chain reaction. *J Urol* 1994; 151:360-4.
173. Noel JC, Thry L, Verhest A, Deschepper N, Peny MO, Sattar AA, Schulman CC, Haot

- J. Transitional cell carcinoma of the bladder: evaluation of the role of human papillomavirus. *Urology* 1994; 44:671-5.
174. Gopalkrishna V, Srivastava AN, Hedau S, Sharma JK, Das BC. Detection of human papillomavirus in cancer of the urinary bladder by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Genotourin Med* 1995; 71:231-3
175. Kamel D, Pääkkö P, Pöllänen R, Vähäkangas K, Lehto VP, Soini Y. Human papillomavirus DNA and abnormal p53 expression in carcinoma of the urinary bladder. *APMIS* 1995; 103:331-8.
176. Kim KH, Kim YS. Analysis of p53 tumor suppressor gene mutations and human papillomavirus infection in human bladder cancers. *Yonsei Med J* 1995; 36:322-31.
177. LaRue H, Simoneau M, Fradet Y. Human papillomavirus in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 1995; 1:435-40.
178. Sano T, Sakurai S, Fukuda T, Nakajima T. Unsuccessful effort to detect human papillomavirus DNA in urinary bladder cancers by polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Pathol Int* 1995; 45:506-12.
179. Mvula M, Iwasaka T, Iguchi A, Nakamura S, Masaki Z, Sugimori H. Do human papillomavirus have a role in the pathogenesis of bladder carcinoma? *J Urol* 1996; 155:471-4.
180. Tenti P, Zappatore R, Romagnoli S, Civardi E, Giunta P, Scelsi R, Stella G, Carnevali L. p 53 overexpression and human papillomavirus infection in transitional cell carcinoma of the urinary bladder: correlation with histological parameters. *J Pathol* 1996; 178:65-70.

181. Barghi MR, Hajimohammadmehdiarbab A, Moghaddam SM, Kazemi B. Correlation between human papillomavirus infection and bladder transitional cell carcinoma. *BMC Infect Dis.* 2005; 5:102.
182. Ben Selma W, Ziadi S, Ben Gacem R, Amara K, Ksaa F, Hachana M, Trimeche M. Investigation of humanpapillomavirus in bladder cancer in a series of Tunisian patients. *Pathol Res Pract.* 2010; 206:740-3.
183. Yavuzer D, Karadayi N, Salepci T, Baloglu H, Bilici A, Sakirahmet D. Role of human papillomavirus in the development of urothelial carcinoma. *Med Oncol.* 2010 Apr 29.
184. Youshya S, Purdie K, Breuer J, Proby C, Sheaf MT, Oliver RT, Baithun S. Does human papillomavirus play a role in the development of bladder transitional cell carcinoma? A comparison of PCR and immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol.* 2005; 58:207-10.
185. De Gaetani C, Ferrari G, Righi E, Bettelli S, Migaldi M, Ferrari P, Trentini GP. Detection of human papillomavirus DNA in urinary bladder carcinoma by in situ hybridisation. *J Clin Pathol.* 1999; 5:103-6
186. Westenend PJ, Stoop JA, Hendriks JG. Human papillomaviruses 6/11, 16/18 and 31/33/51 are not associated with squamous cell carcinoma of the urinary bladder. *BJU Int.* 2001; 88:198-201
187. Tekin MI, Tuncer S, Aki FT, Bilen CY, Aygün C, Ozen H. Human papillomavirus associated with bladder carcinoma? Analysis by polymerase chain reaction. *Int J Urol.* 1999; 6:184-6.
188. Sur M, Cooper K, Allard U. Investigation of human papillomavirus in transitional

- cell carcinomas of the urinary bladder in South Africa. *Pathology*. 2001; 33:17-20.
189. Aynaud O, Tranbaloc P, Orth G. Lack of evidence for a role of human papillomaviruses in transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*. 1998; 159:86-9.
190. Chan KW, Wong KY, Srivastava G. Prevalence of six types of human papillomavirus in inverted papilloma and papillary transitional cell carcinoma of the bladder: an evaluation by polymerase chain reaction. *J Clin Pathol*. 1997; 50:1018-21.
191. Badawi H, Ahmed H, Ismail A, Diab M, Moubarak M, Badawy A, Saber M. Role of human papillomavirus types 16, 18, and 52 in recurrent cystitis and urinary bladder cancer among Egyptian patients. *Medscape J Med*. 2008; 10:232
192. J.T. Aubin, H. Collandre, D. Candotti, D. Ingrand, C. Rouzioux, M. Burgard, et al., Several groups among human herpesvirus 6 strains can be distinguished by Southern blotting and polymerase chain reaction, *J. Clin. Microbiol*. 1991; 29:367–372.
193. Kadish AS, Burk RD, Kress Y, Calderin S, Romney SL. Human papillomaviruses of different types in precancerous lesions of the uterine cervix. *Hum Pathol*. 1986; 17: 384-392.
194. Shigehara K, Sasagawa T, Doorbar J, Kawaguchi S, Kobori Y, Nakashima T, Shimamura M, Maeda Y, Miyagi T, Kitagawa Y, Kadono Y, Konaka H, Mizokami A, Koh E, Namiki M..Etiological role of human papillomavirus infection for inverted papilloma of the bladder. *J Med Virol*. 2011; 83:277-85

ANEXO

Publicaciones realizadas durante la presente Tesis Doctoral

Informe con el factor de impacto y cuartil del Journal Citation Reports

A continuación se detalla el índice de impacto en el año de publicación de las revistas de cada uno de los artículos publicados durante la realización de la presente Tesis, así como el lugar que ocupa y el número de revistas del área temática correspondiente. Se acompaña en cada uno de los artículos de las captura de imágenes de las correspondientes búsquedas para respaldar en el primer caso el índice de impacto y en el segundo el cuartil en el que se encuentra la revista, según en la última relación publicada del Journal Citation Reports (2010).

Título: Human papillomavirus infection and transitional cell carcinoma of the bladder. Immunohistochemistry and in situ hybridization.

Autores (p.o. de firma): López-Beltrán A, Escudero AL, Carrasco-Aznar JC, Vicioso-Recio L.

Revista (año,vol.,pág.): Pathol Res Pract. 1996 Feb;192(2):154-9.

Base de Datos Internacional o Nacional (caso de CC.JJ., CC.SS. Y Humanidades) en las que está indexada: Science Citation Index (ISI Web of Knowledge)

Área temática en la Base de Datos de referencia: Ciencias (Science) PATHOLOGY

Índice de impacto de la revista en el año de publicación del Artículo: 0.753

Lugar que ocupa/Nº de revistas del Área temática: 53 / 76 (Q3)

ISI Web of KnowledgeSM

Journal Citation Reports[®]



Rank in Category: PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE

Journal Ranking ⁱ

For **1997**, the journal **PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE** has an Impact Factor of **0.753**.

This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
PATHOLOGY	N/A	45	N/A

Category Box Plot ⁱ

For **1997**, the journal **PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE** has an Impact Factor of **0.753**.

Journal Citation Reports[®]



Rank in Category: PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE

Journal Ranking ⁱ

For **2010**, the journal **PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE** has an Impact Factor of **1.258**.

This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
PATHOLOGY	76	53	Q3

Category Box Plot ⁱ

For **2010**, the journal **PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE** has an Impact Factor of **1.258**.

Título: Human papillomavirus DNA as a factor determining the survival of bladder cancer patients.

Autores (p.o. de firma): Lopez-Beltran A, Escudero AL, Vicioso L, Muñoz E, Carrasco JC.

Revista (año,vol.,pág.): Br J Cancer. 1996 Jan;73(1):124-7.

Base de Datos Internacional o Nacional (caso de CC.JJ., CC.SS. Y Humanidades) en las que está indexada: Science Citation Index (ISI Web of Knowledge)

Área temática en la Base de Datos de referencia: Ciencias (Science) ONCOLOGY

Índice de impacto de la revista en el año de publicación del Artículo: 2.938

Lugar que ocupa/Nº de revistas del Área temática: 36/185 (Q1)

ISI Web of KnowledgeSM

Journal Citation Reports[®]



Rank in Category: BRITISH JOURNAL OF CANCER

Journal Ranking ⁱ

For **1997**, the journal **BRITISH JOURNAL OF CANCER** has an Impact Factor of **2.938**.

This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
ONCOLOGY	N/A	18	N/A

Category Box Plot ⁱ

For **1997**, the journal **BRITISH JOURNAL OF CANCER** has an Impact Factor of **2.938**.

Journal Citation Reports[®]



Rank in Category: BRITISH JOURNAL OF CANCER

Journal Ranking ⁱ

For **2010**, the journal **BRITISH JOURNAL OF CANCER** has an Impact Factor of **4.831**.

This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
ONCOLOGY	185	36	Q1

Category Box Plot ⁱ

For **2010**, the journal **BRITISH JOURNAL OF CANCER** has an Impact Factor of **4.831**.

Título: Human papillomavirus and bladder cancer.

Autores (p.o. de firma): Lopez-Beltran A, Escudero AL.

Revista (año,vol.,pág.): Biomed Pharmacother. 1997;51(6-7):252-7. Review.

Base de Datos Internacional o Nacional (caso de CC.JJ., CC.SS. Y Humanidades) en las que está indexada: Science Citation Index (ISI Web of Knowledge)

Área temática en la Base de Datos de referencia: Ciencias (Science) MEDICINE, RESEARCH & EXPERIMENTAL

Índice de impacto de la revista en el año de publicación del Artículo: 0.664

Lugar que ocupa/Nº de revistas del Área temática: 48 / 106 (Q2)

ISI Web of KnowledgeSM

Journal Citation Reports[®]



Rank in Category: BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY

Journal Ranking ⁱ

For **1997**, the journal **BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY** has an Impact Factor of **0.664**.

This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
MEDICINE, RESEARCH & EXPERIMENTAL	N/A	38	N/A
PHARMACOLOGY & PHARMACY	N/A	117	N/A

Category Box Plot ⁱ

For **1997**, the journal **BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY** has an Impact Factor of **0.664**.

Journal Citation Reports[®]



Rank in Category: BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY

Journal Ranking ⁱ

For **2010**, the journal **BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY** has an Impact Factor of **2.208**.

This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
MEDICINE, RESEARCH & EXPERIMENTAL	106	48	Q2
PHARMACOLOGY & PHARMACY	252	131	Q3

Category Box Plot ⁱ

For **2010**, the journal **BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY** has an Impact Factor of **2.208**.

Título: Association of human herpesvirus type 6 DNA with human bladder cancer.

Autores (p.o. de firma): Escudero AL, Luque RJ, Quintero A, Alvarez-Kindelan J, Requena MJ, Montironi R, Lopez-Beltran A.

Revista (año,vol.,pág.): Cancer Lett. 2005 Dec 8;230(1):20-4.

Base de Datos Internacional o Nacional (caso de CC.JJ., CC.SS. Y Humanidades) en las que está indexada: Science Citation Index (ISI Web of Knowledge)

Área temática en la Base de Datos de referencia: Ciencias (Science) ONCOLOG

Índice de impacto de la revista en el año de publicación del Artículo: 3.049

Lugar que ocupa/Nº de revistas del Área temática: 33/185 (Q1)

ISI Web of KnowledgeSM

Journal Citation Reports[®]



Rank in Category: CANCER LETTERS

Journal Ranking ⓘ

For **2005**, the journal **CANCER LETTERS** has an Impact Factor of **3.049**.

This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
ONCOLOGY	123	50	Q2

Category Box Plot ⓘ

For **2005**, the journal **CANCER LETTERS** has an Impact Factor of **3.049**.

Journal Citation Reports[®]



Rank in Category: CANCER LETTERS

Journal Ranking ⓘ

For **2010**, the journal **CANCER LETTERS** has an Impact Factor of **4.864**.

This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
ONCOLOGY	185	33	Q1

Category Box Plot ⓘ

For **2010**, the journal **CANCER LETTERS** has an Impact Factor of **4.864**.

Human Papillomavirus Infection and Transitional Cell Carcinoma of the Bladder

Immunohistochemistry and *in situ* Hybridization

A. López-Beltrán¹, A. L. Escudero¹, J. C. Carrasco-Aznar² and L. Vicioso-Recio³

¹Pathology, and ²Urology Units, Córdoba University Medical School and Reina Sofía University Hospital, Córdoba, Spain, ³Malaga University Medical School, Malaga, Spain

SUMMARY

The aim of the present research was to investigate human papillomavirus (HPV) infection by means of immunohistochemistry and *in situ* hybridization in 76 bladder cancer specimens. A biotinylated DNA probe that recognizes HPV 6/11, HPV 16/18 and HPV 31/33/35 was used for *in situ* hybridization. A polyclonal antibody recognizing HPV capsid antigen (HPVcAg) was used for immunohistochemistry. *In situ* hybridization and immunohistochemistry were developed by alkaline phosphatase and immunogold-silver techniques respectively. Our results showed that 25 (32.8%) out of 76 bladder carcinoma specimens reacted with HPVcAg. Twelve (15.7%) out of 76 cases were positive for HPV 16/18-DNA using non-isotopic *in situ* hybridization. Sixteen cases had koilocytosis. No positive signals were found for HPV 6/11 or 31/33/35-DNA probes.

Introduction

Viral studies on mammalian urothelium have shown an association between the bovine papillomavirus and cancer of the bladder in cattle²⁹, while the evidence for Human papillomavirus (HPV) involvement in Transitional cell carcinoma of the bladder (TCC) in man is less clear^{4,20}. The presence of HPV capsid antigen (HPVcAg) in cancer of the bladder has previously been established^{5,20}. Although HPV 6/11-DNA have been identified in condylomata acuminata and cancers of the bladder and urethra^{9,26,30,34,35}, and the presence of HPV 16/18 in TCC has recently been established^{2,4,8,18,20}, the significance of such findings has, however, yet to be substantiated.

The aim of the present research was to investigate human papillomavirus infection in 76 bladder cancer

specimens by means of immunohistochemistry (detecting HPVcAg) and non-isotopic *in situ* hybridization histochemistry (using biotinylated DNA probes specific for HPV 6/11, HPV 16/18 and HPV 31/33/35).

Results

The selected variables representative of the 76 TCC included in this study are illustrated in Table 1. Immunohistochemical staining of bladder tumour sections with HPVcAg using an immunogold-Silver staining technique produced black nuclear staining in 25 (32.8%) of the 76 studied samples. *In situ* hybridization data were available in all 76 cases. No signal was detected using the HPV type 6/11 or 31/33/35 DNA probes. However, positive hybridization signals

Table 1. Selected variables representative of the 76 TCC included in this study

Factors	Categories	Overall No. (%)
No. of patients		76 (100.0)
Age*	Mean ± SD	66.57 ± 1.17
Sex	Male	62 (81.6)
	Female	14 (18.4)
Grade	I	14 (18.4)
	II	28 (36.8)
	III	34 (44.7)
Stage	0	8 (10.5)
	A	45 (59.2)
	B	19 (25.0)
	C	4 (5.2)
HPVcAg	+	25 (32.8)
	-	51 (67.2)
HPV-ISH	+	12 (15.7)
	-	64 (84.3)
K	+	16 (21.0)
	-	60 (79.0)

* Age at diagnosis (years); SD: Standard Deviation; HPVcAg: Human papillomavirus capsid antigen; HPV-ISH: Non isotopic *in situ* hybridization; K: Koilocytosis

were detected in 12 (15.7%) out of 76 investigated cases, when the sections were hybridized with the HPV type 16/18 DNA probe (Fig. 1). Sixteen (21.0%) cases had koilocytosis. The main clinico-

pathologic data of such cases are shown in Table 2. HPV were detected in the nuclei of a large number of tumour cells in the outer epithelial layer. Likewise, no positive signals were found in normal or dysplastic urothelium. Hybridization using the negative DNA control probe was negative. Meanwhile, hybridization of the positive DNA control probe was positive, as well as the additional positive control condylomata acuminata which reacted with the HPV 6/11 DNA probe and the CaSki cells which reacted with HPV 16/18-DNA.

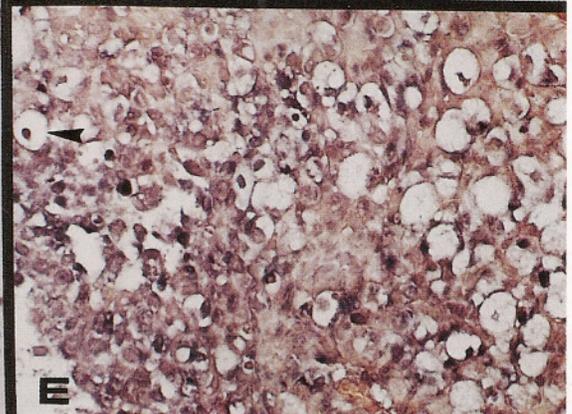
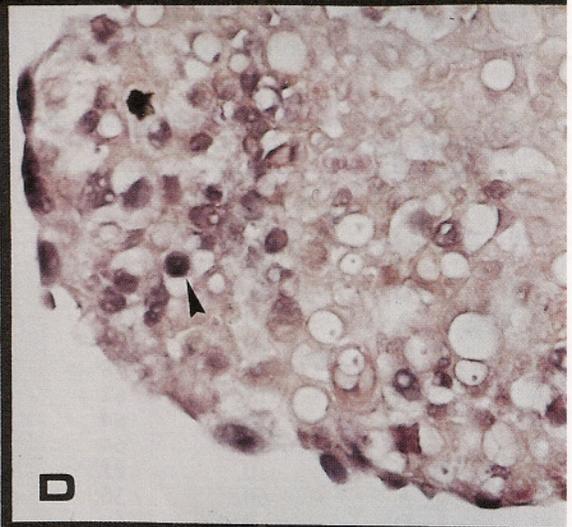
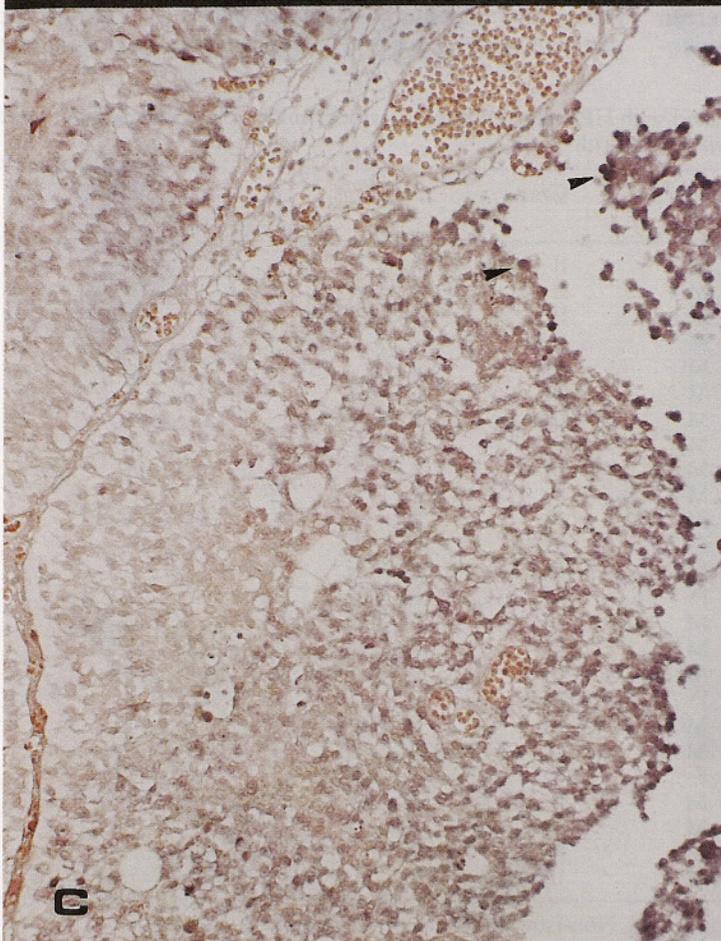
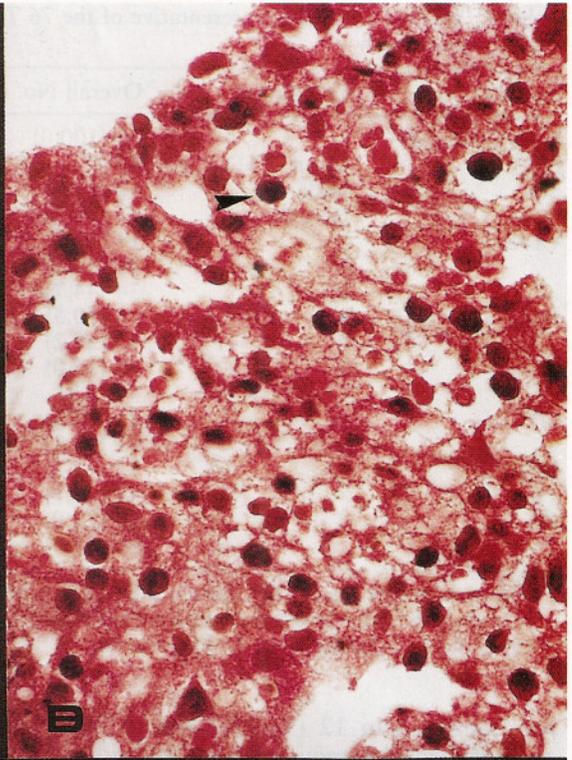
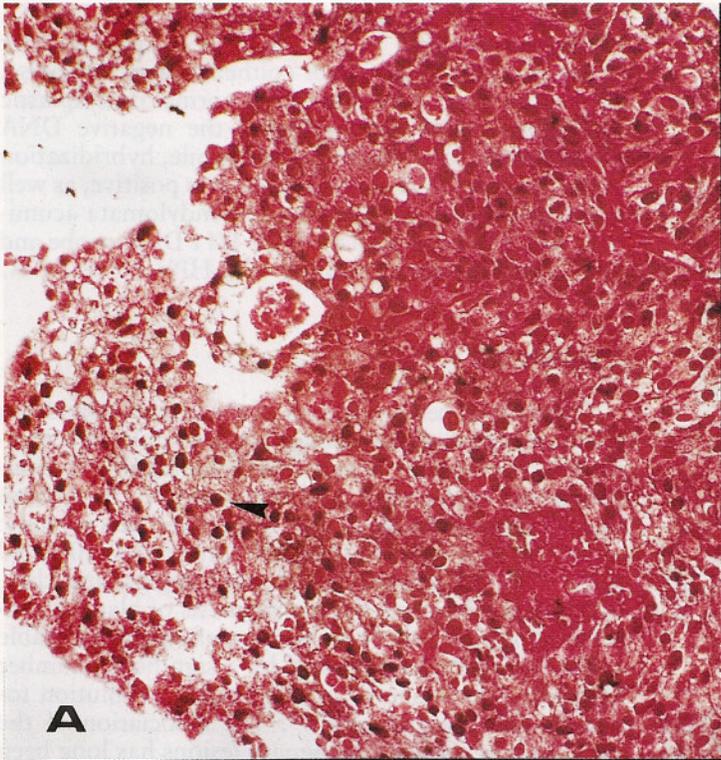
Discussion

Transitional cell carcinoma of the urinary bladder is common, although its etiology is not completely understood⁵. The bladder is particularly vulnerable to environmental carcinogens and many factors have been identified as probable causes of bladder cancer, some of which may increase bladder cancer risk 10-to-50 fold^{11,14,27,31}. Epidemiological, pathological and clinical evidence supports the pathogenesis of bladder cancer as a multistage process, with an often unpredictable course^{21,22,23,24} characterized by a significant number of tumour recurrences and the frequent evolution towards infiltrating disease^{1,2,3}. The association of the HPV with benign and malignant lesions has long been recognized and such lesions are found throughout the genitourinary tract³³. Human papillomaviruses are

Table 2. Clinocopathologic data from 25 cases that reacted with HPVcAg by immunohistochemistry. Note that 12 such cases were reactive with HPV 16/18-DNA by non-isotopic *in situ* hybridization

Case #	D/A	Follow-up (in months)	Age (in years)	Sex	Grade	Stage	K	ISH
1	D	17	73	M	II	A	-	-
2	D	42	80	M	II	A	+	+
3	A	60	61	F	II	A	-	-
4	A	60	74	M	I	A	+	-
5	D	36	78	M	III	A	-	-
6	D	11	62	M	III	C	-	+
7	D	13	64	M	III	B	-	+
8	D	10	64	M	III	B	-	-
9	D	10	85	M	III	A	-	+
10	A	60	50	M	I	A	+	-
11	D	9	60	M	III	B	-	+
12	A	60	57	F	I	O	+	-
13	A	60	66	M	III	A	+	-
14	D	13	57	F	III	B	-	-
15	A	60	51	M	I	A	+	+
16	A	60	51	M	II	A	-	+
17	D	28	46	M	III	B	-	+
18	D	10	75	F	III	C	+	+
19	D	24	51	M	III	B	-	+
20	A	60	60	M	II	A	-	-
21	D	12	64	F	II	A	-	+
22	A	60	78	M	II	A	+	+
23	A	60	75	M	II	A	+	-
24	A	60	60	M	II	A	+	-
25	A	60	83	M	III	B	-	-

D: Death; A: Alive; M: Male; F: Female; K: Koilocytosis; ISH: Non-isotopic *in situ* hybridization



known to infect man, and although most of these proliferations are benign, some may convert to malignancies, a conversion which is related to HPV type¹⁵. In the urinary tract, HPV 6/11 are most commonly associated with condylomata acuminata⁹, whereas HPV 16/18 are associated with carcinomas^{6,8}. In TCC most of the HPV were reported in a small number of patients with an immunodeficient status^{18,30}. Likewise, recently larger series of TCC were screened demonstrating a variable incidence of HPV DNA which ranged from 2.5% to 62%^{2,8}. Negative results were reported by Chang et al.⁷.

Human papillomavirus capsid antigen has been detected in 16–50% of the cases of cervical intraepithelial neoplasia³².

However, a recent study has shown that 96% of such tumours contain HPV DNA, when appropriate DNA *in situ* hybridization techniques are applied¹⁶. Therefore, immunohistochemical detection of HPV capsid antigen may not provide the best estimate of the extent of involvement of human HPV in bladder neoplasia^{5,20}. These differences are even more notable when immunohistochemical data are compared with HPV DNA *in situ* hybridization histochemistry specific for HPV 6/11 and 16/18⁴. Since 13 cases reactive with HPVcAg were found to be negative when HPV DNA *in situ* hybridization was applied, this would suggest that HPVcAg is less specific than ISH, as found in our study. In addition, our results also corroborate previous reports on HPV types found in the urothelium. HPV 6/11-DNA have been previously identified in condylomata acuminata and occasionally in cancers of the bladder and urethra, some of which are related with an immunodeficient status^{9,26,30,34,35}. Our study failed to demonstrate bladder tumours positive for HPV 6/11-DNA, thus supporting the concept that HPV types 6/11 are closely associated with benign lesions^{4,9,26,30}. In contrast, the high risk HPV 16/18 were identified in a variable number of TCC of the bladder, which, in part, corroborate previous research^{4,8,18}. Likewise, HPV 16/18 DNA detected by means of non isotopic *in situ* hybridization has been related with a poor survival^{24,10}.

Our results showed that 75% of the HPV DNA positive cases died of disease in less than 5 years. This results emphasizes HPV as prognostic marker in bladder TCC.

Our study failed to identify transitional cell carcinomas reactive with HPV 31/33/35-DNA which is in agreement with previous reports^{4,20}. However, a small number of cases showing HPV 31/33/35-DNA have been found by Furihata et al.¹⁰. These differences could be explained by methodological reasons since the use of formalin fixatives have been considered critical for

HPV DNA modifications¹⁷. Although this study has shown the presence of human papillomavirus in some TCC of the bladder, further studies are necessary in order to assess more fully the role that these and other HPV types may have in the genesis of these tumours.

Material and Methods

The study includes a group of 76 unselected and consecutive cases of TCC of the urinary bladder from the files of Reina Sofia University Hospital, Córdoba, Spain. All 76 patients underwent transurethral resection (TUR). Their mean age was 66.57 ± 1.17 . Fourteen patients were female. Selected tissue specimens from all biopsies were formalin fixed, paraffin embedded and analyzed for pathological grade and stage¹⁹. Koilocytosis in TCC was evaluated following the criteria of Harveit et al¹².

Immunohistochemical expression of HPVcAg was determined by a modification of the immunogold-silver staining method^{13,20}. Briefly, after dewaxing with xylene and hydration with grading alcohols through distilled water, the sections were washed in PBS, treated with goat normal serum in a 1/200 dilution for 20 min, and then incubated overnight (18 h) at 4 °C with primary antibody (rabbit anti-HPV, Biogenex Laboratories, San Ramon, CA, USA) in a 1/100 dilution. The treatment with the first antibody was followed by the secondary, biotinylated antibody (Goat anti-rabbit IgG, Janssen Biotech NV, B-2430 Olen, Belgium), and then the Auroprobe-LM-streptavidin (Janssen Biotech NV, B-2430 Olen, Belgium). The deposited gold particles were enlarged using the Intense-M-Silver-enhancement kit (Janssen Biotech NV, B-2430 Olen, Belgium). Silver precipitation was observed under the microscope within 15 min, and the reaction stopped by immersion in distilled water. The sections were counterstained with eosine. A case of condylomata acuminata was used as a positive control. The replacement of the primary antibody by the immunoglobulin fraction of non immunized rabbit serum in a 1/100 dilution (Dakopatt, Denmark) was used as a negative control.

In situ hybridization^{3,25} was carried out using Vira-Type-HPV tissue-hybridization Kit and Vira-Type-HPV DNA probes (Life Technologies Inc, Gaithersburg, MD 20877 USA). The Vira-Type-HPV-tissue-hybridization system uses a streptavidin-alkaline-phosphatase conjugate in which the chromogen is 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate in the presence of nitroblue tetrazolium. The Vira-Type-HPV DNA probe is a biotin-based probe detecting HPV types 6–11, HPV types 16/18 and HPV types 31–33–35. The posthybridization wash and hybridization was done under low stringency. Briefly, serial sections were placed on slides pretreated with 2% solution of organosilane in acetone²⁸. The tissue sections were deparaffinized, hydrated, air dried and then treated with the proteinase K solution (2 mg/mL). After denaturing the respective HPV DNA probes cocktail and tissue together at 100 °C for 8 min, the hybridization reaction went for 2 hours at 37 °C beneath glass coverslips. The coverslips were

◀ Fig. 1. Immunoreactivity with a polyclonal antibody against HPVcAg showing black nuclear staining (arrowhead) (A). Close-up view of nuclear staining by HPVcAg (arrowhead) (B) [Immunogold-Silver, $\times 250$ (A); $\times 400$ (B)]. Non-isotopic *in situ* hybridization showing positive signal using a biotinylated DNA probe reactive with HPV type 16/18 (arrowheads) (C $\times 250$). High power view of nuclei of TCC of the bladder hybridized with HPV 16/18-DNA (arrowhead) (D $\times 400$). Koilocytosis in TCC of the bladder. Note the positivity for HPV 16/18-DNA (arrowhead) (E $\times 250$).

removed, sections washed at 37 °C in 2 changes of buffer saline solution containing bovine serum albumin at 37 °C, followed by signal detection. Then, the sections were counterstained with eosine, dehydrated in absolute alcohol, cleared in xylene, and mounted in permanent medium. A positive DNA control probe specific for human genomic DNA sequences was used in each tissue biopsy incubation. The positive DNA control probe allows evaluation of tissue fixation, digestion and denaturation, all of which affect the availability of target DNA. Furthermore, a case of condylomata acuminata reactive with HPV DNA types 6–11 was used as positive control as well as cultivated CaSki cells which served as a positive control for HPV 16. A negative DNA control probe was also included in the present study.

Acknowledgement

This research was supported in part by the grant FISs 94/0064-01-02. The authors wish to thank Ms. Pilar Cano for her excellent technical assistance.

References

- Abel PO (1988) Prognostic indices in transitional cell carcinoma of the bladder. A review. *Brit J Urol* 62: 103–109
- Anwar K, Naiki H, Nakakuki K, Inuzuka M (1992) High frequency of human papillomavirus infection in carcinoma of the urinary bladder. *Cancer* 70: 1967–1973
- Brigati DJ, Myerson D, Leary JJ et al. (1983) Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin-embedded tissue sections using biotin-labelled hybridization probes. *Virology* 126: 32–50
- Bryant P, Davies P, Wilson D (1991) Detection of human papillomavirus DNA in cancer of the urinary bladder by in situ hybridization. *Brit J Urol* 68: 49–52
- Bryant P, Skelly J, Wilson D (1987) Demonstration of papillomavirus structural antigen in human urinary bladder neoplasia. *Brit J Urol* 60: 405–409
- Chang F (1990) Role of papillomavirus. *J Clin Pathol* 43: 269–276
- Chang F, Lipponen P, Tervahauta A, Syrjänen S, Syrjänen K (1994) Transitional cell carcinoma of the bladder: Failure to demonstrate human papillomavirus deoxyribonucleic acid by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *J Urol* 152: 1429–1433
- Chetsanga C, Malmström PU, Gyllensten U, Moreno-Lopez J, Dinter Z, Pettersson U (1992) Low incidence of human papillomavirus type 16 DNA in bladder cancer tumour detected by the polymerase chain reaction. *Cancer* 69: 1208–1211
- Del Mistro A, Koss LG, Braunstein J et al. (1988) Condylomata acuminata of the urinary bladder. Natural history, viral typing and DNA content. *Am J Surg Pathol* 12: 205–215
- Furihata M, Inoue K, Ohtsuki Y, Hashimoto, Terao N, Fujita Y (1993) High-risk human papillomavirus infections and overexpression of p53 protein as prognostic indicators in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer Res* 53: 4823–4827
- Gonzalez C, Lopez-Abente G, Errezola M et al. (1985) Occupation, tobacco use, coffee, and bladder cancer in the county Mataró (Spain). *Cancer* 55: 2031–2034
- Hartveit F, Maele BO, and Thunold S (1992) Koilocytosis in neoplasia of the urinary bladder. *Brit J Urol* 69: 46–48
- Holgate CS, Jackson P, Cowen P, Bird CC (1983) Immunogol silver staining—new method of immunostaining with enhanced sensitivity. *J Histochem Cytochem* 31: 938–944
- Hoover RN, Strasser PH (1980) Artificial sweeteners and human bladder cancer. *Lancet* I: 837–840
- Howley PM (1991) Role of human papillomavirus in human cancer. *Cancer Res* 51: 5019s–5022s
- Kadish AS, Burk RD, Kress Y, Calderin S, Romney SL (1986) Human papillomaviruses of different types in precancerous lesions of the uterine cervix. *Hum Pathol* 17: 384–392
- Karlsen F, Kalantari M, Chitemerere, Johansson B, Haggmar B (1994) Modifications of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation. *Lab Invest* 71: 604–611
- Kitamura T, Yogo Y, Ueki T, Murakami S, Aso Y (1981) Presence of human papillomavirus type 16 genome in bladder carcinoma in situ of a patient with mild immunodeficiency. *Cancer Res* 48: 7207–7211
- Koss LG (1985) Tumours of the urinary bladder. In: Atlas of tumour pathology, fascicle 11. Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC
- Lopez-Beltran A, Carrasco-Aznar JC, Reymundo C, Morales C, Lopez-Pardo R, Santamaria M (1992) Bladder cancer survival and human papillomavirus infection. Immunohistochemistry and in situ hybridization. In: Olsson CA (Ed) *Oncogenes and molecular genetics of urological tumours*, SIU reports 4, pp 83–89. Churchill Livingstone, Edinburgh
- Lopez-Beltran A, Croghan GA, Croghan I, Huben RP, Mettlin C, Gaeta JF (1992) Prognostic factors in survival of bladder cancer. *Cancer* 70: 799–807
- Lopez-Beltran A, Croghan GA, Croghan I, Gaeta JF (1993) Cell and tumour markers' immunohistochemistry in transitional cell carcinoma. *Urol Int* 50: 61–64
- Lopez-Beltran A, Croghan GA, Croghan I, Matilla A, Gaeta JF (1994) Prognostic factors in bladder cancer. A clinicopathologic, immunohistochemical and flow cytometric study. *Am J Clin Pathol* 102: 109–114
- Lopez-Beltran A, Morales C, Reymundo C, Toro M (1986) T-zone Histiocytes and recurrence of paillary urothelial bladder carcinoma. *Urol Int* 44: 205–209
- Masih AS, Stoler MH, Farrow GM, Johansson SL (1993) Human papillomavirus in penile squamous cell lesions. A comparison of an isotopic RNA and two commercial non isotopic DNA in situ hybridization methods. *Arch Pathol Lab Med* 117: 302–307
- Mevorach RA, Cos LR, di Sant'Agnes PA, Stoler M (1990) Human papillomavirus type 6 in grade I transitional cell carcinoma of the urethra. *J Urol* 143: 126–128
- Morrison AS (1984) Advances in the aetiology of urothelial cancer. *Urol Clin North Am* 11: 557–566
- Nuovo GJ, Richart RM (1989) A comparison of biotin- and S-based in situ hybridization methodologies for detection of human papillomavirus DNA. *Lab Invest* 61: 471–476
- Olson C, Pamucku AM, Brobst DF (1965) Papilloma-like virus from bovine urinary bladder tumours. *Cancer Res* 25: 840–847
- Querci della Rovere G, Oliver RTD, McCance DJ, Castro JE (1988) Development of bladder tumour containing HPV type 11 DNA after renal transplantation. *Brit J Urol* 62: 36–38
- Shulte PA, Ringer K, Hemstreet GP et al. (1985) Risk assessment of a cohort exposed to aromatic amines. *J Occup Med* 27: 115–121
- Singer A, Wilters J, Walker P et al. (1985) Comparison of prevalence of human papillomavirus antigen in biopsies

from women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol* 38: 855-857

³³ Syrjänen SM (1990) Basic concepts and practical applications of recombinant DNA techniques in detection of human papillomavirus infection. *APMIS* 98: 95-110

³⁴ Wilczynski SP, Oft M, Cook N, Liao SY, Iftner T (1993) Human papillomavirus type 6 in squamous cell carcinoma of the bladder and cervix. *Hum Pathol* 24: 96-102

³⁵ Wilson RW, Chenggis ML, Unger ER (1990) Longitudinal study of human papillomavirus infection of the female urogenital tract in situ hybridization. *Arch Pathol Lab Med* 114: 155-159

Received August 24, 1994 · Accepted in revised form July 26, 1995

Key words: Human papillomavirus – Urothelium – Urinary bladder, Transitional cell carcinoma

Dr. A. Lopez-Beltran, Unidad Docente de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Avda. Menendez Pidal s/n, E-14071 Córdoba, Spain, Phone #: 34 57 218993, Fax #: 34 57 218229



Human papillomavirus DNA as a factor determining the survival of bladder cancer patients

A Lopez-Beltran¹, AL Escudero¹, L Vicioso², E Muñoz³ and J Carlos Carrasco⁴

¹Department of Pathology, Cordoba University Medical School and Reina Sofia University Hospital, 14071 Cordoba, Spain;

²Department of Pathology, Malaga University Medical School, 29071 Malaga, Spain; Departments of ³Immunology and ⁴Urology, Cordoba University Medical School and Reina Sofia University Hospital, 14071 Cordoba, Spain.

Summary The natural history of transitional cell carcinoma (TCC) of the urinary bladder is somewhat variable, with a significant number of tumour recurrences that occasionally evolve towards an infiltrating disease. The aim of this study was to investigate the presence of human papillomavirus (HPV) DNA in 76 TCC specimens, and then correlate such findings with the overall patient survival. However, other classical prognostic clinical and pathological variables such as pathological grade and stage, koilocytosis, age and sex were also tested. HPV DNA was investigated by means of the highly sensitive polymerase chain reaction (PCR). DNA primers specific for HPV types 6, 11, 16 and 18 were used. Our results showed that 7 (9.21%) out of 76 such cases were reactive for HPV 16 DNA; one of them also reacted with HPV 6 DNA. The statistical analysis was done by the Kaplan–Meier method, Wilcoxon's generalised test for studying the differences in survival curves and Cox's regression analysis for independent prognostic factors. A significant *P*-value was found for pathological grade ($P < 0.0001$) and stage ($P < 0.0001$), HPV 16 DNA ($P = 0.0418$) and koilocytosis ($P = 0.0140$). Thus, pathological grade was the only independent factor in the bladder cancer survival. These observations may prove useful in prognostic stratification of patients with TCC of the bladder.

Keywords: human papillomavirus; polymerase chain reaction; transitional cell tumour; urinary bladder

The presence of human papillomavirus (HPV) DNA has been reported most frequently in association with cervical dysplasias which can progress to malignancies, and benign condylomata acuminata (Stoler *et al.*, 1992; Donalson *et al.*, 1993). Recent studies indicate that some HPVs are associated with bladder carcinoma (Del Mistro *et al.*, 1988; Kitamura *et al.*, 1988; Querci Della Rovere *et al.*, 1988; Bryant *et al.*, 1991; Anwar *et al.*, 1992; Chetsanga *et al.*, 1992; Lopez-Beltran *et al.*, 1992a; Furihata *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1994; Lopez-Beltran and Muñoz, 1995). However, the exact incidence of HPV DNA involved in TCC of the bladder remains controversial (Chang *et al.*, 1994; Lopez-Beltran and Muñoz, 1995), since the reported incidence varies between 2.5% and 62% (Anwar *et al.*, 1992; Chetsanga *et al.*, 1992; Lopez-Beltran *et al.*, 1992a; Lopez-Beltran and Muñoz 1995). Negative results have been reported by Chang *et al.* (1994) and Ashfaq and Vuitch (1994). The prognostic implication of HPV infection in bladder cancer survival was suggested by Lopez-Beltran *et al.* (1992a) and Furihata *et al.* (1993), using non-isotopic DNA *in situ* hybridisation.

The aim of the present research was to investigate HPV incidence in 76 TCC specimens, using polymerase chain reaction (PCR) analysis, and then to correlate such findings with the overall patient survival. This study also included other classic prognosticators, such as the pathological grade and stage, patient age and sex, and koilocytosis. An attempt is also made to ascertain their possible prognostic implication in bladder cancer survival.

Materials and methods

The study group consisted of 76 unselected and consecutive cases of TCC of the urinary bladder received at Reina Sofia University Hospital (Cordoba, Spain). All 76 patients underwent transurethral resection (TUR). Their mean age was 66.57 ± 1.17 . Fourteen patients were female. Selected tissue

specimens from all biopsies, formalin-fixed paraffin-embedded, were analysed for pathological grade and stage. All cases were followed over 5 years. Koilocytosis in TCC was evaluated following the criteria proposed by Hartveit *et al.* (1992).

Sample preparation for PCR

The paraffin-embedded tissues for PCR analysis were cut into 5–10 μm thin sections. To prevent contamination from one paraffin block to another, the knife and the microtome specimen holder were carefully cleaned with xylene after each specimen had been processed. To extract DNA, each section was placed into Eppendorf tubes and the paraffin removed twice with xylene and washed once with 0.5 ml of 100% ethanol to remove the solvent. The samples were then dried and resuspended in 300 μl of digestion buffer (50 mM Tris pH 8.5; 1 mM EDTA; 0.5% Tween 20 and 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of proteinase K), and incubated for 6 h at 55°C. After this incubation the samples were heated at 95°C for 8 min to inactivate the proteinase K. DNA was then extracted twice with phenol–chloroform and the aqueous phase precipitated with 95% ethanol at –20°C overnight. After centrifugation at 13 000 r.p.m. for 15 min the DNA pellet was dried and dissolved in 50 μl of distilled water. The DNA was stored at –20°C until use.

PCR analysis

PCR was performed mixing 10 μl of DNA with 90 μl of a solution containing 2 mM magnesium chloride, 50 mM potassium chloride, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 0.01% gelatin, 200 μM dNTP, 2.5 U of *Taq* DNA polymerase and 2 μM of the following primers: for HPV type 6, the primers were HPV601 and HPV602, which amplify a region of 260 bp in the E5 gene. For HPV type 11 the primers were HPV114 and HPV115, which amplify a region of 350 bp in the L1 gene. For HPV type 16 and HPV type 18, the upstream primer was H1 which is common for both virus strains, and the downstream primers were H2 and H3 respectively, which amplify a 109 bp region from the open reading frame of the E6 gene (Table I). The primers were synthesised using an Applied Biosystem 381A DNA synthesiser (Foster City, CA, USA). The reaction was performed in an automated thermocycler

Table I Sequence of synthetic oligonucleotide primers and complementary oligonucleotide probes used for the PCR in this study

HPV type/gene	Primer or probe	Sequence (5' to 3')	Length (bp) of amplified products
HPV 6/E5	Primer HPV-601	TAGTGGGCTATGGCTCGTC	260
	Primer HPV-602	TCCATTAGCCTCCACGGGTG	
	Probe HPV-603	CATTAACGCAGGGGCGCCTGAAATTGTGCC	
HPV 11/L1	Primer HPV-114	GGAATACATGCGCCATGTGG	350
	Primer HPV-115	CGAGCAGACGTCCGTCCTCG	
	Probe HPV-116	CGCCTCCACCAAATGGTACACTGGAGG	
HPV 16/E6	Primer H1	ATTAGTGAGTATAGACATTA	109
	Primer H2	GGCTTTTGACAGTTAATACA	
	Probe H4	ATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAACAAACCGTTGTG	
HPV 18/E6	Primer H1	ATTAGTGAGTATAGACATTA	109
	Primer H3	GGTTTCTGGCACCGCAGGCA	
	Primer H5	ATGGAGACACATTGGAAAACTAACTAACACTGGGTTATA	

Table II Selected variables representative of the 76 cases of TCC included in this study

Factors	Categories	No. deceased (%)	No. alive (%)	P-value	Overall no. (%)
No. of patients		22 (100.0)	54 (100.0)		76 (100.0)
Age ^a	Mean ± s.d.	66.84 ± 2.45	66.88 ± 1.34		66.57 ± 1.17
Sex	Male	18 (81.8)	44 (81.4)	P=0.8616	62 (81.6)
	Female	4 (18.1)	10 (18.5)		14 (18.4)
Grade	I	– (0.0)	14 (25.9)	P=0.0001 ^{b,c}	14 (18.4)
	II	4 (18.1)	24 (44.4)		28 (36.8)
	III	18 (81.8)	16 (29.6)		34 (44.7)
Stage	O	– (0.0)	8 (14.8)	P=0.0001 ^b	8 (10.5)
	A	7 (31.8)	38 (70.3)		45 (59.2)
	B	11 (50.0)	8 (14.8)		19 (25.0)
	C	4 (18.1)	– (0.0)		4 (5.2)
HPV 16	+	5 (22.7)	2 (3.7)	P=0.0418 ^b	7 (9.2)
	–	17 (77.2)	52 (96.2)		69 (90.7)
Koilocytosis	+	4	12	P=0.0140 ^b	16 (21.0)
	–	18	42		60 (79.0)

^aAge at diagnosis (years). ^bSignificant P-value. ^cIndependent prognostic factor using Cox regression analysis.

(Perkin-Elmer, CT, USA) programmed for 40 cycles of DNA denaturation (95°C), primer annealing (65°C) and template extension (72°C). In the last cycle the extension step was 7 min. Amplified DNA fragments were hybridised with specific [³²P]ATP end-labelled probes. The complexes were electrophoresed in 12% SDS/PAGE gels, which were dried and exposed to XAR film for different periods of time. Primers PC03 and PC04 which amplified a 110 bp fragment of the human β-globin gene, were included as controls for the amount of DNA analysed. Necessary precautions to avoid cross-contamination were taken at all stages of extraction and amplification (Kwok and Higuchi, 1989).

Statistical analysis

The statistical analysis was undertaken using the life test procedure. Univariate analysis of cancer-corrected 5 year survival (defined as death from or with bladder cancer) was done according to the Kaplan–Meier method (Kaplan and Meier, 1958). Differences between survival curves were estimated by the Wilcoxon test (Gehan, 1962). In addition, independent prognostic factors were sought by Cox regression analysis (Cox, 1972). A P-value below 0.05 was regarded as being statistically significant.

Results

The selected variables representative of the 76 TCCs included in this study are illustrated in Table II. The PCR analysis showed positive signals for the HPV type 16 DNA in 7

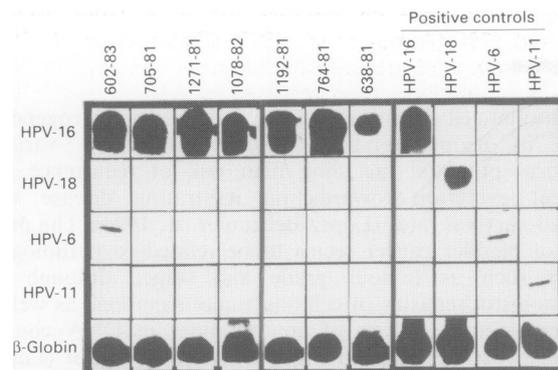


Figure 1 Autoradiographs of positive signals for HPV DNA type 16 and HPV DNA type 6, using PCR analysis.

(9.21%) out of 76 cases investigated. Likewise, one case showed reactivity for both HPV 16 DNA and HPV 6 DNA (Figure 1). Sixteen (21.0%) out of 76 cases had koilocytosis, and one of these HPV 16 DNA. Most patients with TCC (71.4%) associated with HPV DNA were of high pathological grade/stage, and died of disease within 9 to 13 months (Table III).

The univariate chi-squares for the Wilcoxon test showed pathological grade and stage, the presence of HPV 16-DNA and koilocytosis, to be significantly related with survival in all 76 cases. However, pathological grade was found to be an independent prognostic factor in patient survival (Cox regression analysis).

Table III Clinicopathological characteristics of the seven cases of TCC associated with HPV DNA

Case no.	Age	Sex	Follow-up (months)	Grade	Stage	PCR 16	Koilocytosis
14	64	M	D/13	III	B	+	-
16	64	M	D/10	III	B	+ ^a	-
17	85	M	D/10	III	A	+	-
22	60	M	D/9	III	B	+	-
24	57	F	NED/60	I	O	+	+
28	57	F	D/13	III	B	+	-
30	51	M	NED/60	I	A	+	-

^aReactive for both HPV DNA type 16 and HPV DNA type 6. D, death; NED, no evidence of disease; M, male; F, female.

Table IV Studies on HPV DNA of several types investigated in human urinary bladder carcinoma

Reference	Method/HPV type DNA studied	Prevalence no. (%)	HPV type DNA detected
Kitamura <i>et al.</i> (1988)	SBH/HPV 16	^a 1/10 (10.0)	HPV 16
Querci <i>et al.</i> (1988)	SBH/HPV 11	^a 1/1 (100.0)	HPV 11
Bryant <i>et al.</i> (1991)	ISH/HPV 6/11, HPV 16/18	12/76 (15.7)	HPV 16/18
Lopez-Beltran <i>et al.</i> (1992a)	ISH/HPV 6/11, HPV 16/18, HPV 31/33/35	9/18 (50.0)	HPV 16/18
Chetsanga <i>et al.</i> (1992)	PCR/HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33	1/44 (2.5)	HPV 16
Anwar <i>et al.</i> (1992)	ISH/HPV 16	10/20(50.0)	HPV16
	PRC/HPV 6, 11, 16, 18, 33	39/48 (81.0)	HPV 16, 18, 33
Wilczynski <i>et al.</i> (1993)	SBH/PCR/HPV 6, 16, 18	^b 1/22 (4.5)	HPV 6
Furihata <i>et al.</i> (1993)	ISH/HPV 16,18,	28/90 (31.1)	HPV 16, 18, 33
Yu <i>et al.</i> (1993)	PCR/HPV	28/53 (52.8)	HPV 16
		2/53 (3.7)	HPV 18
Salztein <i>et al.</i> (1993)	PCR	0/33 (0.0)	HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33
Chang <i>et al.</i> (1994)	ISH/PCR/HPV 6, 11, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 45, 51-59	0/108 (0.0)	-
Ashfaq <i>et al.</i> (1994)	ISH 6/11, 16/18, 31/33	0/8 (0.0) ^c	-
Lopez-Beltran <i>et al.</i> (1995)	ISH/HPV 6/11, 16/18, 31/33/33	4/76 (5.29)	HPV 16/18
	PCR/HPV 6, 11, 16, 18	7/76 (9.2)	HPV 6, 16
Current study	PCR/HPV 6, 11, 16, 18	7/76 (9.2)	HPV 16/6

^a Patient with mild immunodeficiency. ^b Squamous cell carcinoma. ^c Two of eight reported cases were squamous cell carcinoma. SBH, Southern blot hybridisation; ISH, non-isotopic DNA *in situ* hybridisation.

Discussion

Transitional cell carcinoma of the bladder is a heterogeneous group of neoplasms that typically present a variable biological potential including high risk of recurrence and frequent evolution towards an infiltrating disease with reduced survival rates (Lopez-Beltran *et al.*, 1994). The prognosis of bladder cancer seems to be related to pathological factors such as tumour grade and stage, although the immunohistochemistry of cell and tumour markers as well as flow cytometric analysis of abnormalities in DNA content have also been considered prognostically significant (Lopez-Beltran *et al.*, 1992b). The purpose of this paper was to determine whether or not the finding of HPV DNA in TCC has additional prognostic value in patient survival.

HPVs are known to infect man and although most of these proliferations are benign, some may become malignant, and this malignant transformation is related to HPV type (Howley, 1991). In the genitourinary tract, HPV types 6/11 are most commonly associated with genital condylomata acuminata (Del Mistro, 1988), whereas types 16 and 18 are associated with dysplasias and carcinomas (Chang, 1990). In TCC most HPVs were reported in a small number of patients with an immunodeficient status, (Kitamura, 1988; Querci Della Rovere, 1988). Although, recently a larger series of TCCs were screened, demonstrating a variable incidence of HPV DNA which ranged from 2.5% to 62% (Anwar *et al.*, 1992; Chetsanga *et al.*, 1992; Lopez-Beltran *et al.*, 1992a; Furihata *et al.*, 1993; Lopez-Beltran and Muñoz, 1995). Negative results were reported by Chang *et al.* (1994) and

Ashfaq and Vuitch (1994) (Table IV). In addition, HPV 16/18 DNA detected by means of non-isotopic *in situ* hybridisation has been related with a poor survival (Lopez-Beltran *et al.*, 1992a; Furihata *et al.*, 1993). Our results found a 9.2% incidence of HPV 16 DNA in TCC. Such differences could be explained by methodological reasons (Ashfaq and Vuitch, 1994). In fact, type and time of fixation have been considered important parameters for preservation of DNA (Greer *et al.*, 1991; Karlsen *et al.*, 1994). However, the finding presented here of a significant relationship between the detection of HPV 16 DNA and reduced patient survival, using PCR analysis confirmed previous reports on poor survival of TCC cases presenting with high-risk HPV DNA (Lopez-Beltran *et al.*, 1992a; Furihata *et al.*, 1993) detected by using *in situ* hybridisation. Taken together these results could indicate an additional prognostic value of viral infection in bladder cancer, although pathological grade is the only independent parameter in the survival of bladder cancer as showed by our results. This is in agreement with the finding that most patients with TCC (71.4%) associated with HPV 16 DNA were of high grade. Such results are of interest since pathological grade remains an important prognostic parameter in survival of patients with TCC of the urinary bladder. Finally, we found koilocytosis to be significant in patient survival, which could be related to the increasing incidence of koilocytosis concomitant with increasing pathological grade.

Acknowledgement

This research was supported by Fondo de Investigaciones Sautitarias (FIS) Grant 94/0064-01-02.

References

- ANWAR K, NAIKI H, NAKAKUKI K AND INUZUKA M. (1992). High frequency of human papillomavirus infection in carcinoma of the urinary bladder. *Cancer*, **70**, 1967–1973.
- ASHFAQ R AND VUITCH F. (1994). Human papillomavirus and carcinomas of the female urethra. *J. Urol. Pathol.*, **2**, 195–201.
- BRYANT P, DAVIS P AND WISON D. (1991). Detection of human papillomavirus DNA in cancer of the urinary bladder by *in situ* hybridization. *Br. J. Urol.*, **68**, 49–52.
- CHANG F. (1990). Role of papillomavirus. *J. Clin. Pathol.*, **43**, 269–276.
- CHANG F, LIPPONEN P, TERVAHAUTA A, SYRJÄNEN S AND SYRJÄNEN K. (1994). Transitional cell carcinoma of the bladder: failure to demonstrate human papillomavirus deoxyribonucleic acid by *in situ* hybridization and polymerase chain reaction. *J. Urol.*, **152**, 1429–1433.
- CHETSANGA C, MALMSTRÖM PU, GYLLENSTEN U, MORENO-LOPEZ J, DINTER Z AND PETTERSON U. (1992). Low incidence of human papillomavirus type 16 DNA in bladder tumour detected by polymerase chain reaction. *Cancer*, **69**, 1208–1211.
- COX DR. (1972). Regression models and life-tables. *J.R. Stat. Soc.*, **34**, 187–220.
- DEL MISTRO A, KOSS LG, BRAUNSTEIN J, BENNETT B, SACCOMANO G AND SIMONS KM. (1988). Condylomata acuminata of the urinary bladder. Natural history, viral typing and DNA content. *Am. J. Surg. Pathol.*, **12**, 205–215.
- DONALSON YK, ARENDS MJ, DUVALL E AND BIRD CC. (1993). PCR analysis of the upstream regulatory region of human papillomavirus genes in cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *J. Clin. Pathol.*, **46**, 1021–1023.
- FURIHATA M, INOUE K, OHTSUKI Y, HASHIMOTO H, TERAOKA N AND FUJITA Y. (1993). High-risk human papillomavirus infections and overexpression of p53 protein as prognostic indicators in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer Res.*, **53**, 4823–4827.
- GEHAN E. (1962). A generalized Wilcoxon test for comparing arbitrarily single-censored samples. *Biometrika*, **52**, 203–217.
- GREER CE, LUND JK AND MANOS M. (1991). PCR amplification from paraffin-embedded tissues: Recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR Methods and Applications*, **1**, 46–48.
- HARVEIT F, MAELE BO AND THUNOLD S. (1992). Koilocytosis in neoplasia of the urinary bladder. *Br. J. Urol.*, **69**, 46–48.
- HOWLEY PM. (1991). Role of human papillomavirus in human cancer. *Cancer Res.*, **51**, 5019s–5022s.
- KAPLAN EL AND MEIER P. (1958). Non-parametric estimation from incomplete observation. *J. Am. Stat. Assoc.*, **53**, 457–481.
- KARLSEN F, KALANTARI M, CHITEMERERE M, JOHANSSON B AND HARMAR B. (1994). Modifications of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation. *Lab. Invest.*, **71**, 604–611.
- KITAMURA T, YOGO Y, VEKI T, MURAKAMI S AND ASO Y. (1988). The presence of human papillomavirus type 16 genome in bladder carcinoma *in situ* of a patient with mild immunodeficiency. *Cancer Res.*, **48**, 7207–7211.
- KWOK S AND HIGUCHI R. (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature*, **339**, 237–238.
- LOPEZ-BELTRAN A AND MUÑOZ E. (1995). Transitional cell carcinoma of the bladder: Low incidence of human papillomavirus DNA detected by the polymerase chain reaction and *in situ* hybridization. *Histopathology*, **26**, 565–571.
- LOPEZ-BELTRAN A, CARRASCO JC, REYMUNDO C, MORALES-JIMENEZ C, TORO-ROJAS M AND SANTAMARIA-OSSORIO M. (1992a). Bladder cancer survival and human papillomavirus infection. Immunohistochemistry and *in situ* hybridization. In *Oncogenes and Molecular Genetics of Urological Tumours*, Olsson, CA (ed.) pp. 83–89. Churchill Livingstone: Edinburgh.
- LOPEZ-BELTRAN A, CROGHAN GA, CROGHAN I, HUBEN RP, METTLIN C AND GAETA JF. (1992b). Prognostic factors in survival of bladder cancer. *Cancer*, **70**, 799–807.
- LOPEZ-BELTRAN A, CROGHAN GA, CROGHAN I, MATILLA A AND GAETA JF. (1994). Prognostic factors in bladder cancer. A pathologic, immunohistochemical, and DNA flow-cytometric study. *Am. J. Clin. Pathol.*, **102**, 109–114.
- QUERCI DELLA ROVERE G, OLIVER RTD, MCMANCE DJ AND CASTRO JE. (1988). Development of bladder tumour containing HPV type 11 DNA after renal transplantation. *Br. J. Urol.*, **62**, 36–38.
- SALZTEIN DR, ORIHUELA E, KOCUREK JN, PAYNE DA, CHAN TS AND TYRING SK. (1993). Failure of the polymerase chain reaction (PCR) to detect human papillomavirus (HPV) in transitional cell carcinoma of the bladder. *Anticancer Res.*, **13**, 423–425.
- STOLER MH, RHODES CR, WITHBECK A, WOLINSKY SM, CHOW LT AND BROKER TR. (1992). Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasia. *Hum. Pathol.*, **23**, 117–128.
- WILCZYNSKI SP, OFT M, COOK N, LIAO SY AND IFTNER T. (1993). Human papillomavirus type 6 in squamous cell carcinoma of the bladder and cervix. *Hum. Pathol.*, **24**, 96–102.
- YU ST, WU MM AND LI LM. (1993). Prevalence of human papillomavirus 16 and 18 in transitional cell carcinoma of the bladder. *Chin. Med. J.*, **106**, 494–496.

Human papillomavirus and bladder cancer

A Lopez-Beltran, AL Escudero

Department of Pathology, Cordoba University Medical School and Reina Sofia University Hospital. Cordoba, Spain

Summary – Human papillomavirus (HPV) deoxyribonucleic acid (DNA) has been originally detected in urothelial carcinomas of the bladder in immunocompromized patients. Studies from the general population showed a variable incidence of high risk HPV DNA which ranged from 2.5% to 81%, with HPV 16 DNA occurring more frequently. HPV DNA was detected in both papillary and invasive cancers, although in our experience the overall incidence was low. Most HPV positive cases were of high grade and stage with significant reduced survival or increased recurrence rate after transurethral resection. These results indicate an additional prognostic value of viral infection in bladder cancer. In addition, molecular studies suggest that the HPV related oncoproteins E6 and E7 play a role in bladder carcinogenesis via inactivation and/or degradation of p53 and pRb suppressor gene-associated proteins. The purpose of this review is to provide a brief summary of what is known about HPV and bladder cancer, and to address issues germane to the translation of this information to patient management.

human papillomavirus / bladder cancer / transitional cell carcinoma

INTRODUCTION

While human papillomaviruses (HPVs) have not been proven to exhibit a causative role in human cancers, an accumulating body of evidence suggests that exceptional circumstances, such as allograft transplantation (particularly renal or cardiac) or a genetic predisposition, may (along with various environmental and behavioural factors) allow viral infection to result in malignant growth [16, 23]. Molecular studies have implicated several mechanisms through which HPVs may exert an oncogenic effect. The association of HPV with urological malignancies has also been reported but less intensively investigated compared to cervical neoplasms [21].

The purpose of this paper is to provide a brief summary of what is known about HPV and bladder carcinoma, and to address issues germane to the translation of this information into diagnostic pathology and patient management.

CLASSIFICATION AND TYPES OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS

Papillomaviruses belong to the A genus of *papovaviridae* family. This family of viruses also includes SV40 virus and polyoma virus. Papil-

lomaviruses are widely distributed and infect humans and animals. They are acquired through direct mucosal or cutaneous inoculation. Human papillomaviruses are subdivided into genotypes and subtypes based on their extent of DNA relatedness. More than 35 distinct HPV types are known to infect the genitourinary tract. Over 20 of these HPV types are believed to be cancer-associated. HPV 16 and 18 are considered 'high-risk' while HPV 6 and 11 are perceived to be 'low-risk' and the others as 'intermediate-risk' [23, 32]. HPV 16 and HPV 18 account for almost 70% of the HPV types isolated from cervical carcinomas, with HPV 16 occurring twice as frequently as HPV 18, which is the predominant type in adenocarcinomas, adenosquamous carcinomas and small cell undifferentiated carcinomas [23]. In benign cervical precursor lesions, viral DNA is maintained in a free, extrachromosomal, circular form termed as 'episome'. However, in many cervical cancers as well as in cell lines derived from cervical cancers and human keratinocytes transformed in vitro with HPV, the HPV DNA is integrated into the host genome [24, 32]. Viral integration into the host cell genome has been proposed to play a role in the progression from precancerous lesions to cancer. In HPV 18 positive tumours, the majority of the viral DNA appears to be inte-

grated. However, in HPV 16 positive cervical tumours, integration may vary from 30% to 70%. Integration is thought to have important effects on viral gene expression and the biologic behaviour of HPV infected cells [23, 24, 29, 32].

The association between pathogenic HPV and specific human cancers is based upon the frequent detection of HPV DNA in tumours. However, the detection method used may bias epidemiological and clinical data. Undersensitive detection techniques can lead to false negative results and the assumption that HPV is not associated with a particular tumour type. Over-specific detection techniques can also generate anomalous results by failing to detect previously uncharacterised types and, given the heterogeneity of the papillomaviruses, this may be of paramount importance in both assigning a causal role and in determining the effectiveness of screening procedures [23]. Southern blotting has traditionally been used to detect HPV types in human tissues. This technique offers well characterised sensitivity levels. However, the results obtained can be complicated by various other factors such as viral DNA deletion and rearrangement in malignant tumours and some technical problems. *In situ* hybridisation (ISH) has been used frequently to detect and type HPV DNA with variable success. Some tumours fail to show any HPV DNA when analysed by this method while others show up to 90% detection. The detection rate of ISH depends upon the specificity of the probes used. The main advantage of ISH is that tissue architecture is maintained and specific cell infection can be demonstrated. Other detection techniques merely confirm the presence of HPV DNA in the lesion as a whole. More recently, polymerase chain reaction (PCR) has been used to detect HPV DNA in a variety of human tissues. PCR is much more sensitive and specific than earlier methods of detection. The future of HPV detection and analysis of HPV-associated cancers may be with *in situ*-PCR. This technique offers the sensitivity and specificity of PCR, coupled with the spatial localisation of HPV associated with ISH [23].

DO HPV'S PLAY A ROLE IN THE PATHOGENESIS OF BLADDER CARCINOMA?

HPVs possess an intrinsic oncogenic potential due to the fact that they replicate in non-dividing

cells, and, as their genome is insufficient to encode all of the factors necessary for DNA replication, they must induce their expression in host cells [23, 24, 29, 32]. The viral E1 and E2 proteins are responsible for perverting normal cellular processes in order to reproduce the viral genome. Integration of HPV DNA frequently disrupts the E2 open reading frames, resulting in overexpression of the E6 and E7 oncoprotein and possibly causing genomic instability. The E6 and E7 oncoproteins may function to remove potential blocks in DNA replication caused by p53 or Rb upon the detection of viral DNA. The HPV E6 oncoprotein has been strongly implicated in the transformation of HPV infected cells. E6 has been shown to bind p53 *in vitro*, resulting in the rapid breakdown of p53 via the ubiquitin pathway for protein degradation [32]. Therefore, the cellular levels of p53 are low in cells expressing HPV 16 or 18 E6. Compared with the E6 protein of low oncogenic risk HPVs (ie, HPV 6, 11), the E6 protein encoded by high oncogenic risk HPVs (ie, HPV 16,18) seems to have a higher affinity for p53 and/or accelerates its degradation. Patients with HPV-positive tumours rarely present evidence of p53 mutations, which may suggest distinct etiologic pathways [8, 10, 31]. The HPV E7 protein has also been implicated in cellular transformation and has been shown to bind to Rb, p107, cyclin A and cyclin-dependent kinase 2, as well as other cell-cycle related proteins. The net result of the E7-Rb association is the release of the E2F transcription factor complex from Rb, which then stimulates the transcription of proliferation-dependent genes [23, 32] (fig 1).

Most of the experimental work to date aiming to elucidate the mechanism(s) of action of HPV has focused primarily on 'high risk' genital HPV types 16 and 18. Viral oncogenes associated with specific HPV types and subtypes may exhibit distinct tumorigenic pathways and, in association with the infected cell type, result in lesions of varying oncogenic potential. Not all human papillomavirus infection results in tumour development. For example, introduction of HPV 16 or 18 DNA into rodent cell lines that are already immortalised causes the recipient cells to develop the capacity for anchorage independent of growth and the capacity to form tumours when injected into mice. However, when HPV 16 or 18 DNA is introduced into early passage, nonimmortalised cells, a different result is observed. The recipient cells become immortalised but are not transfor-

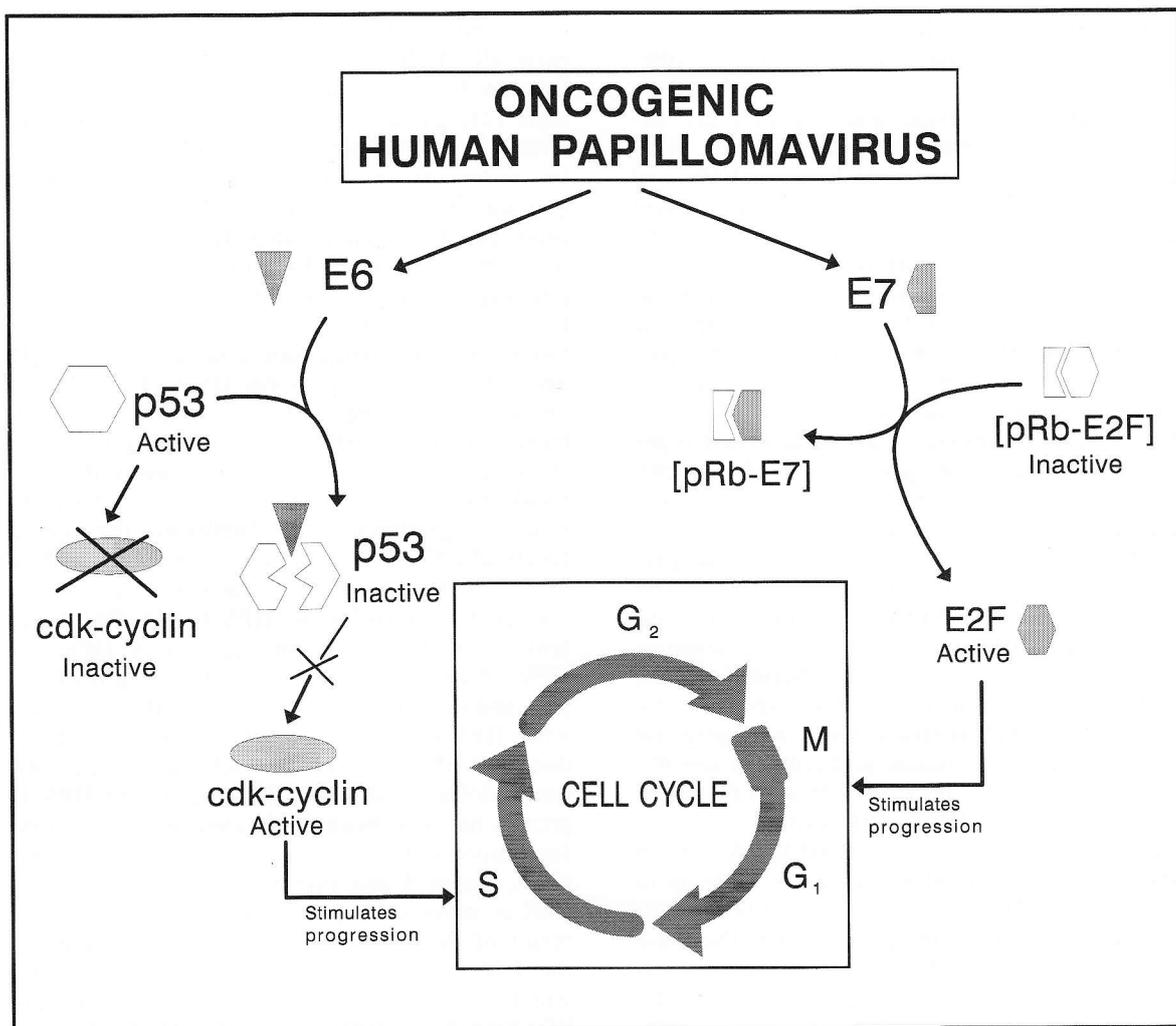


Fig 1. Cell cycle effect of infection with oncogenic human papillomavirus. The E6 oncoprotein appears to alter cell growth through its effects on p53, which results in a loss of p53 activity within cells. Binding of E6 to p53 stimulates degradation of cellular p53 through a selective ubiquitin-dependent proteolytic pathway. The E7 oncoprotein alters the regulated cellular growth control mechanism by binding to pRb and its related proteins and dissociating the E2F-pRb complex, which can stimulate the transcription of the E2F-dependent genes necessary for DNA replication.

med and cannot form tumours in experimental animal systems [32]. Additional cofactors and mutational events may be important in the pathogenesis of bladder cancer and may include chromosomal rearrangements, loss of constitutional heterozygosity and proto-oncogene activation. HPV positive bladder cancer derived cell lines contain mRNA transcripts of the E6 and E7 genes, suggesting that these viral genes are required for maintenance of the transformed phenotype.

Other factors are also involved in the progression from cellular transformation to malignant

growth. Urinary tract infections (including condiloma acuminatum) and smoking may play a significant role in the development of HPV-associated bladder cancers [33]. The presence of high-risk HPV in a significant proportion of bladder tumours and the association of HPV with higher grade and stage tumours and with multicentricity may suggest an etiological role for these viruses in bladder cancer [15, 17, 19]. However, as with other HPV-associated diseases, the precise role of the virus in bladder requires additional detailed studies.

Table I. Studies on HPV of several types investigated in human urinary bladder carcinoma.

<i>Investigation (Year)</i>	<i>Technique-Type of HPV studied</i>	<i>Prevalence</i>	<i>Type of HPV detected</i>
Kitamura et al (1988)	SBH-16	1/10 (10.0) ^a	16
Querci et al (1988)	SBH-11	1/1 (100.0) ^a	11
Bryant et al (1991)	HIS-6/11/16/18	12/76 (15.7)	16/18
Kerley et al (1991)	PCR-6/11/16/18	1/21 (4.7) ^b	11
Anwar et al (1992)	HIS-16 PCR-6/11/16/18/33	10/20 (50.0) 39/48 (81.0)	16 16/18/33
Chetsanga et al (1992)	PCR-6/11/16/18/31/33	1/44 (2.5)	16
Knowles (1992)	PCR-6/11/13/16/18/30/33/45/51	0/100 (0.0)	–
Lopez-Beltran et al (1992)	HIS-6/11/16/18/31/33/35	9/18 (50.0)	16/18
Shibutani et al (1992)	SBH-6/11/16/18/31/33	4/20 (20.0)	6/11/16/18/31/33
Furhata et al (1993)	HIS-16/18/33	28/90 (31.1)	16/18/33
Saltztein et al (1993)	PCR-6/11/16/18/31/33	0/33 (0.0)	–
Song-ting et al (1993)	PCR-16/18	28/53 (52.8) 2/53 (3.7)	16 18
Wilczynsky et al (1993)	SBH-6/16/18/31 PCR-6/16/18	1/22 (4.5) ^b 1/22 (4.5) ^b	6 6
Agliano et al (1994)	PCR-16/18	23/46 (50.0)	16/18
Ashfaq et al (1994)	HIS-6/11/16/18/31/33	0/8 (0.0) ^c	–
Chang et al (1994)	HIS- /11/18/31/33/35/39/40/45/51/59 PCR-6/11/18/31/33/35/39/40/45/51/59	0/108 (0.0) 0/108 (0.0)	– –
Maloney et al (1994)	PCR-6/11/13/16/18/31/32/33/35/45/51	1/22 (4.4) ^{a,b} 0/20 (0.0)	18 –
Noel et al (1994)	PCR- 6/11/16/18/33	2/75 (2.7) ^a	16
Gopalkrishna et al (1995)	HIS-16 PCR-16	1/10 (10.0) 2/10 (20.0)	16 16
Kamel et al (1995)	HIS-6/11/16/18/31/33	27/47 (57.0)	6/11/16/18/31/33
Kim and Kim (1995)	PCR-6/11/16/18	8/23 (34.78)	16/18
LaRue et al (1995)	PCR-6/11/16/18/33	28/71 (39.0)	11/16
Lopez-Beltran et al (1995)	HIS-6/11/16/18	12/76 (15.8)	16/18
Sano et al (1995)	HIS-16/18 PCR-6/11/16/18/31/33/42/52/58	1/80 (1.25) 0/80 (0.0)	16 –
Lopez-Beltran et al (1996)	PCR-6/11/16/18	7/76 (9.2)	6/16
Mvula et al (1996)	PCR-16/18	1/36 (3.0)	16
Tenti et al (1996)	PCR-6/11/16/18/33	26/79 (32.9)	16/18

a: patient with mild immunodeficiency; b: squamous cell carcinoma; c: two of the 8 reported cases were squamous cell carcinoma; ISH: in situ hybridisation; PCR: polymerase chain reaction; SBH: southern blot hybridisation.

HPVS AND BLADDER CANCER

The link between HPV and bladder tumours has been established in several lines of research. Condyloma acuminatum is the most common benign lesion of the bladder associated with HPV infection. HPV DNA type 6 and 11 have been found commonly associated to condylomata acuminata of the urinary bladder [7]. More recently, HPV DNA has been demonstrated in carcinomas of the bladder [1-4, 6, 8-13, 15-22, 25, 29-31, 34]. Thus, compelling evidence currently suggests that HPV might be associated with bladder cancer. However, the significance of the association of HPV to bladder cancer remains controversial [15-19, 21, 26].

Early studies showed examples of HPV-associated bladder tumours in immunocompromised patients. One patient presented an urothelial carcinoma in situ associated with HPV 16 DNA [13]. All others had squamous cell carcinoma associated to HPV DNA types 6, 11, or 18 [11, 20, 25]. Recently, larger series of transitional cell carcinomas from the general population were screened, demonstrating a variable incidence of high-risk HPV DNA which ranged from 2.5% to 81%, with HPV 16 occurring more frequently [1-4, 6, 8-13, 15-22, 25, 29-31, 34]. HPV DNA was detected in both papillary and invasive cancers [17, 18]. Other studies lack any HPV DNA in transitional cell carcinoma (table I) [5, 14, 21, 27, 28]. Some authors observed that HPV DNA in bladder tumours was mainly in episomal form, which suggests that the presence of HPV in the bladder is coincidental rather than pathogenic, hence, it is unlikely that HPV has an important causal role in bladder carcinogenesis [29]. Others found the viral DNA was not only present in the tumour cells but it was also actively transcribed [24]. Some of the discrepancies reported in the literature on the association of HPVs to bladder cancer have been considered to be related to geographical differences, DNA preparation and amplification conditions, as well as sample fixation [15]. In our experience, there is a low incidence (10%) of HPV 16 DNA in transitional cell carcinoma of the bladder. Seventy one percent of such positive cases are of high grade and stage, with significant reduced survival. These results could indicate an additional prognostic value of viral infection in bladder cancer [17]. An increased risk of tumour recurrence after trans-

urethral resection has also been reported in association with HPV infection [15]. Certain HPV types present a paradox of type and tissue morphology. For example, HPV 18 DNA is strongly associated with carcinoma of the cervix of specific histologic types (adenocarcinoma, adenocarcinoma, and small cell undifferentiated carcinoma). Meanwhile, HPV 16 is strongly associated with squamous cell carcinoma. In the urinary bladder, most transitional cell carcinomas are related to HPV 16 DNA [16-19], while squamous cell carcinomas are related to HPV types 6, 11, and 18 [20]. It seems that there is a type-specific association between HPV and human cancers. Koilocytosis, which is common in cervical intraepithelial and invasive neoplasm, is also common in bladder cancer. The correlation of such histologic findings with HPV DNA is uncertain. Recent studies suggest that koilocytosis as seen in urothelial carcinoma of the bladder is a poor indicator of HPV infection [16, 17].

In conclusion, bladder carcinogenesis is a complex, multistep process with a multifactorial aetiology. Thus HPV infection may play a role in the pathogenesis of a subset of transitional cell carcinoma of the bladder. HPV may be engaged more actively in the pathogenesis of bladder carcinomas arising in immunosuppressed patients. The association of HPV 16 DNA with higher grade and stage tumours of the bladder may suggest an additional prognostic value of viral infection in a subset of bladder cancer patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported in part by Grant 96/2094 (Fondo de Investigacion Sanitaria de la Seguridad Social, Madrid, Spain). AL Escudero is recipient of a fellowship from the Fundacion Cultural Hospital Reina Sofia-Cajasur, Cordoba, Spain.

REFERENCES

- 1 Agliano AM, Gradilone A, Gazzaniga P, Napolitano M, Vercillo R, Albonici L, Naso G, Manzari V, Frati L, Vecchione A. High frequency of human papillomavirus detection in urinary bladder cancer. *Urol Int* 1994;53:125-9
- 2 Anwar K, Naiki H, Nakakuki K, Inuzuka M. High frequency of human papillomavirus infection in carcinoma of the urinary bladder. *Cancer* 1992;70:1967-73
- 3 Ashfaq R, Vuitch F. Human papillomavirus and carcinomas of the female urethra. *J Urol Pathol* 1994;2:195-201

- 4 Bryant P, Davies P, Wilson D. Detection of human papillomavirus DNA in cancer of the urinary bladder by in situ hybridisation. *Br J Urol* 1991;68:49-52
- 5 Chang F, Lipponen P, Tervahauta A, Syrjänen S, Syrjänen A. Transitional cell carcinoma of the bladder: Failure to demonstrate human papillomavirus deoxyribonucleic acid by in situ hybridisation and polymerase chain reaction. *J Urol* 1994;152:1429-33
- 6 Chetsanga C, Malmström PU, Gyllensten U, Moreno-Lopez J, Dinter Z, Pettersson U. Low incidence of human papillomavirus type 16 DNA in bladder tumor detected by the polymerase chain reaction. *Cancer* 1992;69:1208-11
- 7 Del Mistro A, Koss LG, Braunstein J, Bennett B, Saccomano G, Simons KM. Condylomata acuminata of the urinary bladder. *Am J Surg Pathol* 1988;12:205-15
- 8 Furihata M, Inoue K, Ohtsuki Y, Hashimoto H, Terao N, Fujita Y. High-risk human papillomavirus infections and overexpression of p53 protein as prognostic indicators in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer Res* 1993;53:4823-7
- 9 Gopalkrishna V, Srivastava AN, Hedau S, Sharma JK, Das BC. Detection of human papillomavirus in cancer of the urinary bladder by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Genitourin Med* 1995;71:231-3
- 10 Kamel D, Pääkkö P, Pöllänen R, Vähäkangas K, Lehto VP, Soini Y. Human papillomavirus DNA and abnormal p53 expression in carcinoma of the urinary bladder. *APMIS* 1995;103:331-8
- 11 Kerley SW, Persons DL, Fishback JL. Human papillomavirus and carcinoma of the urinary bladder. *Mod Pathol* 1991;4:316-19
- 12 Kim KH, Kim YS. Analysis of p53 tumor suppressor gene mutations and human papillomavirus infection in human bladder cancers. *Yonsei Med J* 1995;36:322-31
- 13 Kitamura T, Yogo Y, Veki T, Murakami S, Aso Y. Presence of human papillomavirus type 16 genome in bladder carcinoma in situ of a patient with mild immunodeficiency. *Cancer Res* 1988;48:7207-11
- 14 Knowles MA. Human papillomavirus sequences are not detectable by Southern blotting general primer-mediated polymerase chain reaction in transitional cell tumours of the bladder. *Urol Res* 1992;20:297-301
- 15 LaRue H, Simoneau M, Fradet Y. Human papillomavirus in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 1995;1:435-40
- 16 Lopez-Beltran A, Carrasco JC, Reymundo C, Morales-Jimenez C, Lopez-Pardo R, Santamaria M. Bladder cancer survival and human papillomavirus infection. Immunohistochemistry and in situ hybridization. In: Olsson CA, ed. *Oncogenes and molecular genetics of urological tumours*. London: Churchill Livingstone, 1992:83-9
- 17 Lopez-Beltran A, Escudero AL, Carrasco-Aznar JC, Vicioso-Recio L. Human papillomavirus infection and transitional cell carcinoma of the bladder. *Path Res Pract* 1996;192:154-9
- 18 Lopez-Beltran A, Escudero AL, Vicioso L, Muñoz E, Carrasco JC. Human papillomavirus DNA as a factor determining the survival of bladder cancer patients. *Br J Cancer* 1996;73:124-7
- 19 Lopez-Beltran A, Muñoz E. Transitional cell carcinoma of the bladder: low incidence of human papillomavirus DNA detected by the polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Histopathology* 1995;26:565-9
- 20 Maloney KE, Wiener JS, Walther PJ. Oncogenic human papillomaviruses are rarely associated with squamous cell carcinoma of the bladder: evaluation by differential polymerase chain reaction. *J Urol* 1994;151:360-4
- 21 Mvula M, Iwasaka T, Iguchi A, Nakamura S, Masaki Z, Sugimori H. Do human papillomaviruses have a role in the pathogenesis of bladder carcinoma? *J Urol* 1996;155:471-4
- 22 Noel JC, Thiry L, Verhest A, Deschepper N, Peny MO, Sattar AA, Schulman CC, Haot J. Transitional cell carcinoma of the bladder: evaluation of the role of human papillomaviruses. *Urology* 1994;44:671-5
- 23 O'Connor DP, Bennett MA, Murphy GM, Leader MB, Kay EW. Do human papillomavirus cause cancer? *Curr Diagn Pathol* 1996;3:123-5
- 24 Oft M, Böhm S, Wilczynski SP, Iftner T. Expression of the different viral mRNAs of human papillomavirus 6 in a squamous cell carcinoma of the bladder and cervix. *Int J Cancer* 1993;53:924-8
- 25 Querci Della Rovere G, Oliver RTD, McCance DJ, Castro JE. Development of bladder tumour containing HPV type 11 DNA after renal transplantation. *Br J Urol* 1988;62:36-8
- 26 Reznikoff CA, Kao CH, Messing EM, Newton M, Swaminathan SA. Molecular genetic model of human bladder carcinogenesis. *Sem Cancer Biol* 1993;4:143-52
- 27 Salzstein DR, Orihuela E, Kocurec JN, Payne DA, Chan TS, Tyring SK. Failure of the polymerase chain reaction (PCR) to detect human papillomavirus (HPV) in transitional cell carcinoma of the bladder. *Anticancer Res* 1993;13:423-5
- 28 Sano T, Sakurai S, Fukuda T, Nakajima T. Unsuccessful effort to detect human papillomavirus DNA in urinary bladder cancers by the polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Pathol Int* 1995;45:506-12
- 29 Shibutani YF, Schoenberg MP, Carpinello VL, Malloy TR. Human papillomavirus associated with bladder cancer. *Urology* 1992;40:15-17
- 30 Song-ting Y, Ming-ming W, Li-ming L. Prevalence of human papillomaviruses 16 and 18 in transitional cell carcinoma of bladder. *Chinese Med J* 1993;106:494-6
- 31 Tenti P, Zappatore R, Romagnoli S, Civardi E, Giunta P, Scelsi R, Stella G, Carnevali L. p53 overexpression and human papillomavirus infection in transitional cell carcinoma of the urinary bladder: correlation with histological parameters. *J Pathol* 1996;178:65-70
- 32 Tjount-Won P, Fujiwara H, Wright TC. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer* 1995;76:1902
- 33 Vecchia CL, Negri E, D'Avanzo B, Savoldelli R, Franceschi S. Genital and urinary tract diseases and bladder cancer. *Cancer Res* 1991;51:629-31
- 34 Wilczynski SP, Oft M, Cook N, Liao SY, Iftner T. Human papillomavirus type 6 in squamous cell carcinoma of the bladder and cervix. *Hum Pathol* 1993;24:96-102

Association of human herpesvirus type 6 DNA with human bladder cancer

Alberto L. Escudero^a, Rafael J. Luque^b, Ana Quintero^a, Jose Alvarez-Kindelan^c,
Maria J. Requena^c, Rodolfo Montironi^d, Antonio Lopez-Beltran^{b,*}

^a*Biomedical Research Unit, Cordoba University Medical School and Reina Sofia University Hospital,
Avda. Menendez Pidal s/n, E-14004 Cordoba, Spain*

^b*Department of Pathology, Faculty of Medicine, Cordoba University Medical School and Reina Sofia University Hospital,
Avda. Menendez Pidal s/n, E-14004 Cordoba, Spain*

^c*Urology Service, Cordoba University Medical School and Reina Sofia University Hospital, Avda. Menendez Pidal s/n,
E-14004 Cordoba, Spain*

^d*Department of Pathology, Marche Region University, Via Conca, 60020 Torrette di Ancona, Italy*

Received 4 November 2004; received in revised form 10 December 2004; accepted 13 December 2004

Abstract

We examined the presence of human herpesvirus type 6 (HHV6) DNA in a series of 74 bladder carcinomas from a Mediterranean population to elucidate their possible role as cofactor in the development of bladder cancer with or without associated human papillomavirus (HPV) infection. HHV-6 type B DNA was present in 5 men (6.8%) out of the 74 tumors investigated; two of them had associated HPV-16 DNA in the same specimen. In one case that had associated urothelial carcinoma in situ, both HHV-6B and HPV-16 DNA were present. In conclusion, the low incidence of HHV-6B in bladder cancer and the ubiquitous nature of HHV-6 infection are more consistent with a bystander role rather than cofactor in the oncogenesis of bladder cancer.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Bladder cancer; Carcinogenesis; Human herpesvirus type 6; Human papillomavirus

1. Introduction

The role of DNA viruses in the oncogenesis of bladder urothelial tumors remains controversial and most reports concentrate on human papillomavirus

(HPV) [1–10]. In general DNA viruses as pathogenic factors in cases of urothelial bladder carcinoma have received little attention; and to our knowledge no previous studies on human herpesvirus type 6 (HHV-6) incidence in bladder tumors have been reported. HHV-6 might act as oncogenic cofactor of HPV infected bladder cancer and evidences suggest that HHV-6 contain in vitro transforming genes which are retained in both transformed and tumor-derived cell

* Corresponding author. Tel.: +34 957 218993; fax: +34 957 218229.

E-mail address: em1lobea@uco.es (A. Lopez-Beltran).

lines [1,3–5,7,11]. As reported, the current working hypothesis is that HPV is necessary, but not sufficient, for the development of premalignant and malignant lesions of the genital tract [3,12,13]. Recent studies have shown that HHV-6 can replicate in vitro in human epithelial cells including cervical epithelial cells and that molecular clones of HHV-6 can transactivate HPV promoters in vitro thus enhancing the expression of the viral oncoproteins E6 and E7 [3,13,14]. These findings open a way of investigating the possible association between HHV-6 and HPV not only in cervical cancer but in other epithelial tumors including urothelial bladder carcinomas [12].

The aim of our study was to investigate the presence of HHV-6 DNA in carcinomas of the urinary bladder from a Mediterranean-based population and explore their possible role as cofactor of bladder cancers with or without associated HPV infection.

2. Material and methods

The study series included 74 tumor samples and 22 non-malignant bladder specimens (normal urothelium $n=10$; chronic non-specific cystitis $n=12$) that were retrieved from Reina Sofia University Hospital (Cordoba, Spain) files. Specimens obtained by transurethral resection or cystectomy were formalin-fixed and paraffin-embedded following standard procedure. The mean age of patients was 61.8 ± 7.3 (range 43–78). Six (6.2%) patients were female. The tumors were classified according to WHO (World Health Organization) grading criteria and clinically staged following the TNM (Tumor, Node, Metastasis) 2002 revision [15,16]. They included 38 (51.3%) low grade superficial (stage Ta or T1), and 36 (48.7%) high grade (stages T2–T4); 17 (23%) had associated urothelial carcinoma in situ. Representative paraffin blocks were selected based on the amount of tumor present and additional studies included the assessment of p53 status by immunohistochemistry and the Streptavidin–biotin peroxidase method (LSAB staining kit, DakoCytomation, Denmark). P53 was then quantitated using the grid-counting method to establish a labeling index (LI) (percentage of positive nuclei in

1000 cells). A LI of $\geq 10\%$ was considered positive for p53 over-expression.

2.1. DNA extraction and PCR analysis for HPV and HHV-6

Three to four 10 μm tissue sections from each block were collected into microcentrifuge tubes and paraffin was removed twice with xylene and washed once with 0.5 ml of 100% ethanol to remove the solvent. The samples were incubated for 6 h at 55 °C in 300 μl of digestion buffer (50 mM Tris pH 8.5; 1 mM EDTA; 0.5% Tween 20 and 200 μg ml of proteinase K). The solution was heated at 95 °C for 10 min to inactivate proteinase K. DNA was then extracted twice with phenol–chloroform and the aqueous phase precipitated with 95% ethanol at –20 °C overnight. The quality of the DNA was assessed by PCR amplification of human β -globin DNA fragment of 536 bp with KM29 (5'-GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG-3') and RS42 (5'-GCTCACTCAGTGTGGCAAAG-3') primers, which demonstrated the absence of inhibitors and the integrity of processed DNA. Specimens were further tested with the L1 consensus HPV primers MY11 (5'-GCCCAGGGACATAACAATGG-3') and MY09 (5'-CGTCCCAGGGGATACTGATC-3') and PCR products were visualized on ethidium bromide stained agarose gels.

Positive samples for generic HPV infection were amplified with HPV 6, 11, 16 and 18 specific primers pairs resulting in amplification of HPV 16 DNA fragment of 152 bp with the primers HPV964 (5'-AATGCTAGTGCTTATGCAGC-3') and the primer HPV965 (5'-ATTTACTGCAACATTGGGTAC-3'). PCR was performed mixing 5–10 μl of purified DNA with a solution containing 2 mM magnesium chloride, 50 mM potassium chloride, 10 mM Tris–HCl, pH 8.3, 0.01% gelatine, 200 μM dNTP, 2.5 U of Taq DNA polymerase and 2 μM of the primers. All the reactions were carried out with an automated DNA thermal cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). Cycling parameters were 95 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min, for 40 cycles, followed by a final extension at 72 °C for 7 min. Amplified DNA fragments were hybridised with specific [^{32}P]ATP end-labeled probe HPV966 (5'-GCAAACCACCTA-TAGGGGAACACTGGGGCA-3'). The complexes

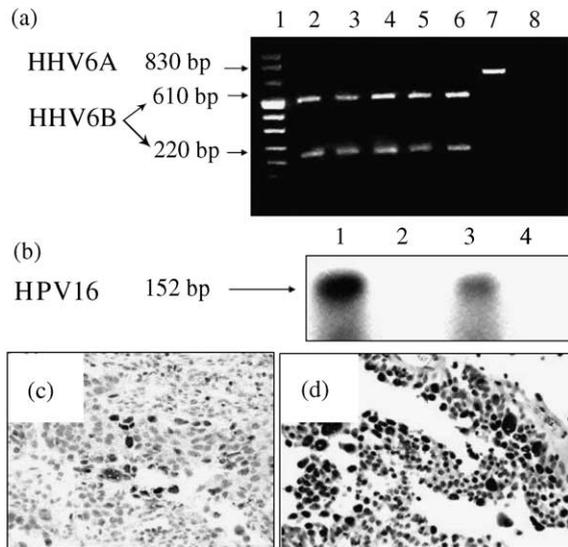


Fig. 1. (a) Agarose gel electrophoresis showing restriction fragment length patterns of human herpesvirus type 6 in bladder carcinomas. Lane 1: molecular weight marker: Roche's VIII from 19 to 1114 bp. Lanes 2–6: patient's sample restricted with endonuclease *Hind*III thus giving two bands at approximately 610 and 220 bp which is the characteristic restriction pattern of human herpesvirus type 6B. Lane 7: not restricted pattern in a control specimen showing a band at approximately 830 bp which is characteristic of human herpesvirus type 6A. Lane 8: negative control. (b) Autoradiograph of PCR amplified positive signals for human papillomavirus type 16 DNA in bladder carcinoma co-infected with herpesvirus type 6B (case 4). Lane 1: positive control. Lane 2: negative control. Lane 3: patient's specimen. Lane 4: white sample. (c and d) Immunohistochemical expression of p53 in human herpesvirus type 6B specimens showing (c) negative finding (expression in <10% of tumor cells) in case 3 and (d) positive finding (expression in \geq 10% of tumor cells) in case 4 (Streptavidin–biotin peroxidase method, c and d \times 250).

were electrophoresed in 12% SDS/PAGE gels, which were dried and exposed to XAR film for different periods of time. Positive controls included SiHa and HeLa cells.

A nested PCR protocol was employed in the amplification of HHV-6 DNA sequences [17,18]. The 830 bp (external primer A: 5'-GATCC-GACGCCTACAAACAC-3'; external primer C: 5'-CGGTGTCACACAGCATGAACTCTC-3') and 750 bp (internal primer HS6AE: 5'-CGGCCATT-TAACGGAACCCTAG-3'; internal primer HS6AF: 5'-TCCAGAGAAAGGGTGTGCG-3') products were amplified by first and second round PCR, respectively, by 40 amplification cycles of denaturation at 92 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min and extension at 72 °C for 2 min, followed by a final extension at 72 °C for 7 min. The products of the reactions were characterized by 1.5% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. Following, first round amplified 830 bp products were digested with *Hind*III and visualized on agarose gels. This distinguished HHV-6 variant A from variant B; HHV-6B fragments, which contain an internal restriction site for *Hind*III, are cleaved into two fragments of approximately 610 and 220 bp [17]. Appropriate positive controls included blood mononuclear cells of a patient with exanthema subitum known to be infected by HHV-6B; and from an AIDS patient infected with HHV-6A. Special precautions to avoid cross-contamination and respiratory contamination were taken at all stages of DNA extraction and amplification procedure.

Table 1

Clinical and pathological findings in five cases of bladder urothelial carcinoma showing human herpesvirus type 6 DNA

Biopsy specimen	Sex/age (years)	Tumor type	Grade/clinical stage ^a	HPV-16	HHV-6B	p53
1	M/51	UC	HG/T4N1M1	–	+	+
2	M/66	UC	HG/T3N0M0	–	+	+
3	M/59	UC	HG/T1N0M0	–	+	–
4	M/53	UC	HG/T3N1M1	+	+	+
5	M/60	UC+CIS	HG/T2N0M0	+ ^b	+ ^b	–

M, male; UC, urothelial carcinoma; CIS, urothelial carcinoma in situ; HPV-16, human papillomavirus type 16 DNA; HHV-6B, human herpesvirus type 6B DNA; p53, immunohistochemical expression of p53 (– (negative) <10% vs. + (positive) \geq 10%).

^a Grade according to WHO classification and clinical stage according to TNM 2002 revision.

^b UC and CIS with both HPV-16 and HHV-6B.

3. Results

Human herpesvirus type 6B DNA was present in five men (6.8%) out of the 74 tumors investigated; two of them had associated human papillomavirus type 16 DNA (40%) in the same specimen which represents 16.7% of the total number of cases with HPV 16 DNA ($n=12$) in the series of 74 bladder tumors (Fig. 1). In one case that had associated urothelial carcinoma in situ, both HHV-6B and HPV-16 DNA were present (Table 1). None of 22 non-malignant bladder specimens investigated showed HHV-6 or HPV DNA. None of investigated tumors in the present study had HHV-6A. The clinical and pathologic characteristics of HHV-6 positive patients included high grade tumors in all (5 (13.9%) out of 36 high grade tumors). One patient had stage T1 and the remaining four had stages T2–T4 (statistical significance: $P=0.023$, Fisher exact test). Three cases, stages T3–T4 over-expressed p53 ($\geq 10\%$) and two cases stage T1 or T2, respectively, had p53 ($< 10\%$) negative tumors.

4. Discussion

None of investigated cases in the present study had HHV-6A; it is believed that the majority of clinical infections in immunocompetent hosts are HHV-6B infections and that HHV-6A contributes to infections in immunocompromised hosts and some neurological manifestations [4,5,18]. HHV-6 is rarely shed in the genital tract, and our study shows a low incidence (6.8%) of HHV-6 DNA associated to high grade and stage bladder cancer. This agrees with observations in cervical cancer specimens showing 1–10% incidence [11,12,19]. A role for HHV-6 in cervical cancer is supported by findings such HHV-6 DNA can transform human keratinocytes in vitro and can accelerate HPV-induced tumor growth in nude mice, possibly by increasing expression of HPV E6 and E7 oncoproteins through transactivation of HPV promoters [2,3,13,14]. HPV-induced immortalization results in a population of epithelial cells susceptible to other carcinogens such as HHV-6 [19]. This opens a way of investigating the possible association between HHV-6 and HPV in bladder cancer, since the current working hypothesis is that HPV is necessary, but not sufficient

for the development of a subset of premalignant and malignant lesions of the genitourinary tract; but in bladder cancer HPV infection seems to be of variable incidence and highly influenced by demography or geographical factors [6,8,9]. In favor of an oncogenic potential for HHV-6 is the finding of transactivating and transforming activities localized to HHV-6 ORF-1 which bound to p53 and inhibited p53-activated transcription [4,5,11]. These activities, coupled with the detection of ORF-1 in malignant tissues, may indicate a role of ORF-1 in human cancer [11]. In addition, HHV-6 oncoproteins exhibit the same characteristics as the oncoproteins of several DNA tumor viruses such SV40 and polyomavirus T-antigens, adenovirus E1B, and HPV-16 E6 because of their ability to bind to and inactivate host tumor suppressor proteins such as p53 [4,5], but in vivo evidences of this association in both cervical and bladder cancers are currently lacking. However, it might explain p53 accumulation observed in our study which is probably related to high grade and stage of tumors more than to the HHV-6 DNA status, although as reported, nuclear p53 accumulation might be due to a functional inactivation of the protein by the HHV-6 ORF-1 [4,5,11].

Recently, the search for cofactors involved in the multi-step oncogenic pathway of epithelial tumors has received much interest [2]. Sexually transmitted agents, particularly viral infections, have been postulated to have a synergistic role in the carcinogenesis of cervical neoplasia [2]. Apart from herpes simplex virus, which has long been suspected to act as an initiator in the development of cervical cancer, and that has recently been reported associated to bladder cancer [7,20], other herpesviruses are also potential candidates [2]. There are numerous reports of other possible disease associations involving HHV-6. The difficulty with these studies is that, as HHV-6 infection is ubiquitous and the tissue tropism widespread, the detection of HHV-6 DNA in a pathological condition may be a consequence of viral reactivation by a pathological condition rather than the etiological cause [4]. A biological explanation of how HHV-6 might contribute to the pathogenesis of the condition is usually lacking [4]. Therefore, the low incidence of HHV-6B DNA in our study is more consistent with a bystander role rather than cofactor in the oncogenesis of bladder cancer.

Acknowledgements

Supported by the Grants 96/2094 and 03/0952 (FIS, Madrid, Spain).

References

- [1] D.V. Ablashi, J. Bernbaum, J.A. DiPaolo, Human herpesvirus 6 as a potential copathogen, *Trends Microbiol.* 3 (1995) 324–327.
- [2] P.K. Chan, M.Y. Chan, W.W. Li, D.P. Chan, J.L. Cheung, A.F. Cheng, Association of human beta-herpesviruses with the development of cervical cancer: bystanders or cofactors, *J. Clin. Pathol.* 54 (2001) 48–53.
- [3] M. Chen, H. Wang, C.D. Woodworth, P. Lusso, Z. Berneman, D. Kingma, et al., Detection of human herpesvirus 6 and human papillomavirus 16 in cervical carcinoma, *Am. J. Pathol.* 145 (1994) 1509–1516.
- [4] D.H. Dockrell, Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features, *J. Med. Microbiol.* 52 (2003) 5–18.
- [5] J. Doniger, S. Muralidhar, L.J. Rosenthal, Human cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transactivate, *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (1999) 367–382.
- [6] M. Furihata, K. Inoue, Y. Ohtsuki, H. Hashimoto, N. Terao, Y. Fujita, High-risk human papillomavirus infections and overexpression of p53 protein as prognostic indicators in transitional cell carcinoma of the urinary bladder, *Cancer Res.* 53 (1993) 4823–4827.
- [7] P. Gazzaniga, R. Vercillo, A. Gradilone, I. Silvestri, O. Gandini, M. Napolitano, et al., Prevalence of papillomavirus, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and herpes simplex virus type 2 in urinary bladder cancer, *J. Med. Virol.* 55 (1998) 262–267.
- [8] A. Lopez-Beltran, A.L. Escudero, L. Vicioso, E. Munoz, J.C. Carrasco, Human papillomavirus DNA as a factor determining the survival of bladder cancer patients, *Br. J. Cancer* 73 (1996) 124–127.
- [9] A. Lopez-Beltran, A.L. Escudero, Human papillomavirus and bladder cancer, *Biomed. Pharmacother.* 51 (1997) 252–257.
- [10] C. Swanton, N. Jones, Strategies in subversion: de-regulation of the mammalian cell cycle by viral gene products, *Int. J. Exp. Pathol.* 82 (2001) 3–13.
- [11] F. Kashanchi, J. Araujo, J. Doniger, S. Muralidhar, R. Hoch, S. Khleif, et al., Human herpesvirus 6 (HHV-6) ORF-1 transactivating gene exhibits malignant transforming activity and its protein binds to p53, *Oncogene* 14 (1997) 359–367.
- [12] N. Romano, F.M. Romano, E. Viviano, F. Vitale, M.R. Villafrate, A.M. Perna, et al., Rare association of human herpesvirus 6 DNA with human papillomavirus DNA in cervical smears of women with normal and abnormal cytologies, *J. Clin. Microbiol.* 34 (1996) 1589–1591.
- [13] M. Chen, N. Popescu, C. Woodworth, Z. Berneman, M. Corbellino, P. Lusso, et al., Human herpesvirus 6 infects cervical epithelial cells and transactivates human papillomavirus gene expression, *J. Virol.* 68 (1994) 1173–1178.
- [14] T. Yoshikawa, F. Goshima, S. Akimoto, T. Ozaki, T. Iwasaki, T. Kurata, et al., Human herpesvirus 6 infection of human epidermal cell line: pathogenesis of skin manifestations, *J. Med. Virol.* 71 (2003) 62–68.
- [15] G. Sauter, F. Algaba, M.B. Amin, C. Busch, J. Cheville, T. Gasser, et al., Non invasive urothelial neoplasias, in: J.N. Eble, G. Sauter, J.I. Epstein, I. Sesterhenn (Eds.), *WHO Classification of Non-invasive Papillary Urothelial Tumors, World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs*, IARCC Press, Lyon, 2004, pp. 110–111.
- [16] F. Greene, D.L. Page, I.D. Fleming, A.G. Fritz, C.M. Balch, D.G. Haller, M. Morrow, *AJCC Cancer Staging Manual*, Springer, New York, 2002, pp. 335–340.
- [17] J.T. Aubin, H. Collandre, D. Candotti, D. Ingrand, C. Rouzioux, M. Burgard, et al., Several groups among human herpesvirus 6 strains can be distinguished by Southern blotting and polymerase chain reaction, *J. Clin. Microbiol.* 29 (1991) 367–372.
- [18] S. Dewhurst, K. McIntyre, K. Schnabel, C.B. Hall, Human herpesvirus 6 (HHV-6) variant B accounts for the majority of symptomatic primary HHV-6 infections in a population of U.S. infants, *J. Clin. Microbiol.* 31 (1993) 416–418.
- [19] D. Tran-Thanh, A. Koushik, D. Provencher, P. Drouin, J. Dubuc-Lissoir, P. Gauthier, et al., Detection of human herpes virus type 6 DNA in precancerous lesions of the uterine cervix, *J. Med. Virol.* 68 (2002) 606–610.
- [20] N. Kaku, K. Kashima, T. Daa, I. Nakayama, S. Yokoyama, Herpes simplex infection in urothelial carcinoma, *Virch. Arch.* 445 (2004) 68–73.