“PRESENCIA Y GENOTIPIFICACION DEL VPH EN DESORDENES POTENCIALMENTE MALIGANOS DE LA CAVIDAD BUCAL EN DOS GRUPOS POBLACIONALES DE LA COSTA ATLANTICA”

DRA. MARTHA CARMONA LORDUY

ASTRID CAROLINA AHUMADA BLANCO

SHEILLY MELISA BANDA BARRIOS

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES

CARTAGENA DE INDIAS, D. T. y C.

2019

NOTA DE ACEPTACIÓN:

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

Firma del presidente del jurado

_____

Firma del jurado

_____

Firma del jurado

Cartagena de Indias, D. T. y C., 3 de mayo de 2019

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN 6
INTRODUCCIÓN 7
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 9
2. JUSTIFICACIÓN 11
3. OBJETIVOS 13
3.1. OBJETIVO GENERAL: 13
3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS: 13
4. MARCO TEÓRICO 13
4.1. GENERALIDADES 13
4.2. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN MUCOSA ORAL 17
4.3. DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN Y LESIONES DE VPH EN BOCA 18
5. METODOLOGIA PROPUESTA 19
5.1. TIPO DE ESTUDIO 19
5.2. MUESTRA 20
5.2.1. Criterios de inclusión 20
5.2.2. Criterios de exclusión 21
5.2.3. Recolección de datos 21
6. INSTRUMENTOS Y VARIABLES 21
6.1. ANALISIS HISTOPATOLOGICO 21
6.1.2. Identificación de VPH y genotipificación 23
6.1.3. Genotipificación 23
7. ANALISIS ESTADISTICO 24
7.1. VARIABLES Y OPERALIZACIÓN 25
8. RESULTADOS 28
9. DISCUSIÓN 32
10. CONCLUSIONES 34
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 35

LISTA DE TRABLAS

Tabla 1. Lesión y condición precancerosa. 20
Tabla 2. Análisis Histopatológico. 22
Tabla 3. Genotipificación. 24
Tabla 4. Variables y Operalización. 25
Tabla 5. Frecuencia y porcentaje de las lesiones. 29

LISTA DE GRAFICAS

Grafica 1. Histograma. 31

RESUMEN

Introducción: De la relación de Virus del papiloma humano (vph) y desordenes potencialmente (dpm) malignos podemos decir que en los últimos años se ha evidenciado la implicación del virus del papiloma humano en el desarrollo de lesiones malignas en cavidad oral resaltando como posible explicación que la preferencia viral por esta región anatómica se debe a las grandes similitudes histológicas con la mucosa del cuello uterino.

Objetivo: Describir la presencia y genotipificación del vph en dpm de la cavidad bucal en dos grupos poblacionales de la costa atlántica.

Metodología*:* Estudio Analítico de corte transversal, realizado en 47 pacientes con dpm, quienes dieron su consentimiento para participar en la investigación. Se describen características principales de los sujetos de estudio y se diagnostican mediante biopsia las lesiones encontradas. Se dividió en dos partes, la primera consistió en una caracterización epidemiológica de los sujetos y La segunda parte consto de la identificación del virus del vph en los dpm.

Resultados: Se tomaron 47 muestras de las cuales el mayor porcentaje fue en el sexo femenino, El DPM predominante fue paladar del fumador invertido con 33 pacientes, seguida de liquen plano y queilitis actinica con 3 pacientes cada una. En cuanto a la localización el más predominante fue paladar y lengua con 27 pacientes. En cuanto a la raza la más predominante fue la raza negra.

Conclusiones: Es cierto que algunos diagnósticos particulares están más asociados con la presencia de VPH, sin embargo, estos datos muestran que la topografía de la lesión se asocia significativamente a la frecuencia de VPH de una lesión particular.

INTRODUCCIÓN

El cáncer oral se caracteriza por ser una neoplasia maligna de comportamiento agresivo, con una alta tasa de mortalidad y baja tasa de supervivencia; este se presenta con mayor frecuencia como el carcinoma de células escamosas. Los carcinomas de células escamosas representan más del 90% de los tumores malignos de la orofaringe[1], y durante los últimos 20 años en países subdesarrollados se ha incrementado su frecuencia[2]. Es una patología de etiología multifactorial donde inciden factores como la edad, sexo, raza, predisposición genética, el estado nutricional, el consumo de tabaco y alcohol. En los últimos años, diversos autores pusieron en evidencia la implicación del virus del papiloma humano (VPH) en el desarrollo de lesiones precancerosas y potencialmente malignas de la cavidad oral. Se considera que el VPH de alto riesgo es importante en el desarrollo de la enfermedad, ya que según reportes epidemiológicos existen frecuencias de prevalencia que varían desde el 20% hasta el 80%, dependiendo de la región geográfica[3]. Una posible explicación de la preferencia viral por esta región anatómica se debe a que el epitelio de la cavidad oral presenta grandes similitudes histológicas con la mucosa del cuello uterino.

La creciente incidencia del cáncer oral en las últimas décadas requiere la necesidad de comprender mejor el papel del VPH en el desarrollo de este tipo de cáncer. En Colombia solo existe un estudio asociado a VPH, realizado por Quintero y colaboradores en el 2013, donde se reportó en cabeza y cuello una prevalencia de 18.9%, y en la cavidad oral una prevalencia de 13.3%. Además, existen pocos datos epidemiológicos acerca de la incidencia de este tipo de cáncer; algunos reportes

---

[1] SYRJÄNEN, Shkodran y SYRJÄNEN, Karl. The history of papillomavirus research. En: Central European Journal of Public Health. Vol. 16, Aug, 2008; p. 13-7.

[2] MÜNGER, Kurt y HOWLEY, Paul. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. En: Virus Research. Vol. 89, Nov, 2002; p. 213-28.

[3] RAHKOLA, Pione. Association between high risk papillomavirus DNA and nitric oxide release in the human uterine cervix. En: Gynecologic Oncology. Vol. 114, Aug, 2009, no.2; p.323-6.

han sido emitidos por el Instituto Nacional de Cancerología (INC, 2011), donde se evidencia que aproximadamente se presentan 95 casos anuales en el país[4].

Algunas evidencias indican que ciertos genotipos específicos de estos virus son necesarios, pero no totalmente suficientes para ocasionar la transformación maligna, debido a que requieren algunas acciones sinérgicas de otros eventos iniciadores[5]. Agregando que los individuos con presencia de VPH tienen mayor riesgo de desarrollar un cáncer oral en comparación con aquel individuo que no está expuesto al virus.

[4] INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA. Anuario estadístico 2009. Bogotá: Impresos en Buenos y Creativos S.A.S. Vol. 7, Sep, 2011. p. 26-8.
[5] DELIGEOROGLOU, Eric. HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy. En: Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology. Vol. 67, Feb, 2005; p. 250-6.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Existe la presencia de VPH en desordenes potencialmente malignos de la cavidad oral?

Esta pregunta de investigación se hace con el objetivo de evidenciar claramente cómo influye en la cavidad oral la presencia del virus de VPH y de algunos desordenes potencialmente malignos e identificar el genotipo viral, considerando si es de alto o bajo riesgo.

Teniendo en cuenta que en la actualidad se ha incrementado en un alto porcentaje los pacientes infectados con el virus y a su vez la presencia de diversos desordenes como leucoplasia, el liquen plano oral atípico, la eritroplasia y la quelitis actínica para lo cual se propone una investigación descriptiva y documental basándonos en la evaluación clínica y en la literatura nacional e internacional para poder llegar a diagnósticos más acertados.

La infección por VPH en piel y mucosas es una de las alteraciones más frecuentes; la transmisión del virus a los tejidos orales es factible por autoinoculación, sexo oral y comunicación vertical. A la fecha han sido identificados más de 240 tipos de VPH y 25 han sido asociados con lesiones orales benignas como la hiperplasia epitelial focal, lesiones premalignas y malignas, también, se han identificado en mucosa sana[6]. La presencia de VPH en mucosa normal sugiere que el epitelio oral puede actuar como un reservorio para el virus. Los tipos de VPH varían de acuerdo al tropismo del tejido en el que se encuentran, su asociación con diferentes lesiones y su potencial oncogénico[7]. Además, los tipos de VPH que pueden ser encontrados en una región particular cambian con el paso de los días y es probable que un

[6] BRAGA RIBEIRO, Karina. Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: results from two large case–control studies in high-incidence regions. En: International Journal of Epidemiology. Vol. 40, 2011; p.489–502.
[7] MAROCCHIO. Op. cit., p.267-73.

sistema inmunológico deprimido sea el factor más importante en la infección por VPH en otras áreas del cuerpo.

Teniendo en cuenta que la mucosa bucal tiene una prevalencia muy alta de los VPH 6, 11, 16 y 18, que suelen asociarse con lesiones precancerosas o con potencialmente maligno.

En Colombia, la incidencia del cáncer oral no está tan bien establecida y menos aún la relación existente entre el VPH y neoplasias malignas en cavidad oral, debido a que la información epidemiológica con relación a este tipo de patología es escasa y los métodos para establecer su presencia están aún en caminos investigativos.

2. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades del aparato estomatognático relacionadas con el VPH son frecuentes, la mayoría de ellas son neoformaciones benignas[8], no obstante, se ha reportado la presencia de VPH en lesiones premalignas, malignas y en mucosa sana[9], lo que sugiere que el epitelio oral puede actuar como un reservorio para VPH[10].

Se ha postulado que el VPH juega un papel importante en el desarrollo del cáncer oral, particularmente cuando se asocia a tabaquismo y alcoholismo[11] y, se considera que la exposición en edades tempranas predispone a los individuos al desarrollo de neoplasias malignas, ya que la infección persistente por virus de alto riesgo provoca inestabilidad genómica en las células, haciéndolas susceptibles a alteraciones genéticas que pueden conducir a transformaciones celulares y carcinomas[12].

El vínculo entre el VPH y las lesiones orales epiteliales ha sido sugerido, aunque el papel preciso del virus en su etiopatogénesis es desconocido. Los criterios histopatológicos utilizados para el diagnóstico de estas enfermedades son generalmente los mismos que se aplican en el diagnóstico de lesiones cervicouterinas, aun cuando las características histológicas y morfológicas del epitelio tanto en cérvix como en boca son diferentes[13]. Por otra parte, no se han

---

[8] ESTRADA PEREIRA, Guillermo. Infección por virus del papiloma humano en la cavidad bucal. En: Medisan. Vol. 19, Jun, 2015; p. 300-6.
[9] CHÁIREZ ATIENZO, Pedro. Presencia del Virus Papiloma Humano en la Cavidad Oral: revisión y Actualización de la Literatura. En: International Journal of Odontostomatology. Vol. 9, Jul, 2015; p. 233-8.
[10] Rebolledo Cobos M., Arango Fernández H., Rebolledo Cobos R., Alonso Brujes I.. Rol del virus del papiloma humano en el desarrollo de carcinoma oral: una revisión. Av Odontoestomatol [Internet]. 2016 Jun [citado 2019 Feb 21] ; 32(3): 135-144.
[11] KUMAR, Rafik. Alcohol and tobacco increases risk of high risk HPV infection in head and neck cancer patients: study from North-East Region of India. En: PloS one. Vol. 10, 2015; p. 10-5.
[12] BROUWER, AF, et al. Age effects and temporal trends in HPV-related and HPV-unrelated oral cancer in the United States: a multistage carcinogenesis modeling analysis. En: PloS one. Vol. 11, 2016; p.115-9.
[13] SARDUY NÁPOLES, Martín. Correlación citohistológica en las neoplasias intraepiteliales cervicales y en la identificación del VPH en esas lesiones. En: Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología. Vol. 35, 2009; p. 24-7.

realizado estudios para validar la utilidad de estos criterios para el diagnóstico de las lesiones causadas por VPH en boca.

Desafortunadamente, la mayoría de los pacientes no cuentan con los recursos suficientes para costear un estudio que permita identificar el tipo viral una vez que ha sido confirmada una infección por VPH. Por lo que es necesario contar con estudios que validen los criterios utilizados para el diagnóstico de lesiones orales por VPH y de alto riesgo para carcinogénesis en lesiones malignas en cavidad oral, o en su caso, definir criterios que permitan establecer un diagnóstico definitivo o identificar lesiones sospechosas que requieran de estudios especializados y que permitan evaluar los genotipos de VPH que más prevalecen en éstas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL:

- Identificar la presencia y genotipificación del vph el desordenes potencialmente malignos de la cavidad bucal en dos grupos poblacionales de la costa atlántica.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Describir las características sociodemográficas de la población objeto de estudio: edad, sexo, procedencia y habito de fumar
- Identificar clínica e histopatológicamente los desórdenes potencialmente malignos en los sujetos objeto de estudio.
- Genotipificar los VPH encontrados si hay de alto y bajo riesgo y por último ser asociados con los desórdenes potencialmente malignos

4. MARCO TEÓRICO

4.1. GENERALIDADES

Los desórdenes potencialmente malignos de la cavidad oral comprenden distintas entidades, que, sin recibir tratamiento, pueden evolucionar a un carcinoma invasor. Son relativamente frecuentes, con una incidencia en la población general del 2.5% aproximadamente. Las lesiones más significativas de la mucosa oral son la leucoplasia, el liquen plano oral atípico, la eritoplasia y la queilitis actínica. Se han involucrado diversos factores en la etiología de estas lesiones como el tabaco, alcohol, factores locales de tipo dentario y protésico, mala higiene bucal y exposición solar. La detección de los desórdenes potencialmente malignos en un estadio temprano, especialmente aquellos de alto riesgo de transformación, es de gran importancia para prevenir su progresión al cáncer.

El término “desordenes potencialmente malignos” se utiliza para describir aquellas situaciones clínicas que conllevan un riesgo incrementado de convertirse en cáncer. Incluye todas las alteraciones morfológicas de la mucosa oral que preceden a una lesión maligna.

Por otra parte, se debe tener en cuenta que el virus del papiloma humano (VPH) es el responsable de múltiples manifestaciones en boca, las cuales generalmente se caracterizan por lesiones vegetantes, verrugosidades, o lesiones papulares. La incidencia de la enfermedad en boca ha aumentado ya que el contagio por vía sexual es una de las principales vías de contagio, lo que también permite que cada vez exista un mayor número de diagnósticos de VPH oncogénico en cavidad bucal.

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus desnudo, con unos 55 mm de diámetro, un núcleo de ADN de doble cadena circular pertenece a la familia papilomaviridae. Su genoma está conformado por 7.200 a 8.000 pares de base con un peso molecular de 5.2x16 daltons, cubierto por una capside icosahedrica compuesta de 72 capsomeros que lo envuelve. Constituye un grupo viral heterogéneo que posee gran afinidad por los epitelios, es capaz de producir lesiones

hiperplasicas, papilomatosas y verrugosas tanto en la piel como en mucosa, y en los últimos años se demuestra que juega un importante papel en la carcinogénesis.

La adquisición del VPH se puede producir con el inicio de las relaciones sexuales en la adolescencia. Se ha reportado que las mujeres jóvenes tienen mayor riesgo, debido a que esta posibilidad se incrementa por el número de compañeros sexuales y por la promiscuidad de la pareja. Aquellos individuos que inician su actividad sexual más precozmente adquieren la infección por VPH con mayor frecuencia[14]. La edad y la actividad sexual son factores determinantes para sufrir una infección por VPH[15]. Las adolescentes adquieren más fácilmente la infección debido también, a que el VPH tiene especial avidez por las células cilíndricas y los cambios que acontecen de forma natural en el cérvix de las adolescentes, constituyen un terreno fértil. La incidencia de infección por VPH disminuye con la edad, debido a la modificación en la respuesta inmunitaria, para tener un nuevo repunte en los años peri y posmenopáusicos[16].

Los VPH habitualmente infectan el epitelio escamoso, aunque en la mayoría de los casos la infección es eliminada eficazmente en un plazo de uno o dos años por el organismo, ocasionando anomalías citológicas o histológicas cervicales menores y transitorias, habitualmente subclínicas[17], pueden también producir lesiones benignas como la neoplasia intraepitelial cervical y la persistencia de cualquiera de los aproximadamente 13 a 18 genotipos de VPH carcinogénicos, puede causar una lesión precancerosa cuyo diagnóstico no se establece hasta varios años después de la infección causante[18]. El tiempo de incubación es variable, entre seis semanas y dos años, mientras que el intervalo entre la infección por VPH y la progresión hacia

[14] MICHIELS. Op. cit., p. 362-8.
[15] SCARDINA, Angelo, PISANO, Tony y MESSINA, Paolo. Oral and cervical lesions associated with human papillomavirus. En: Recenti Progressi in Medicina. Vo. 100, May, 2009; p.261-6.
[16] ORTHOLAN, Cecil. Oral cavity squamous cell carcinoma in 260 patients aged 80 years or more. En: Radiotherapy and Oncology. Vol. 93, Dic, 2009, no.3; p. 516-23.
[17] RANKIN, Kevin. Oral health in cancer therapy. En: Texas Dental Journal. Vol. 126, May, 2009, no.5; p. 389-97.
[18] MICHIELS. Op. cit., p. 362-8.

malignidad, dura de 10 a 20 años, por lo que el cáncer de cérvix es poco habitual en mujeres por debajo de los 25 años y su incidencia aumenta progresivamente hasta alcanzar un pico entre los 40 y los 50 años de edad[19]. El ciclo viral está coordinado con la división y la diferenciación de los queratinocitos, de manera que la infección se inicia en las células escamosas del estrato basal, cuando el virus hace contacto con ellas a través de una erosión en la piel o mucosas[20].

La infección por VPH ha sido clasificada en tres manifestaciones diferentes: forma clínica, subclínica y latente. La infección clínica es fácilmente detectable a simple vista y aparece en forma de verruga. La forma subclínica ocurre más frecuentemente en el cérvix y es diagnosticada por colposcopia después de aplicar ácido acético, con una sensibilidad del 87% al 99% y una especificidad más baja, que varía desde un 23% hasta un 87% a nivel mundial. Sin embargo, la infección latente solo puede ser diagnosticada mediante técnicas de biología molecular como la hibridación in situ y la reacción en cadena de la polimerasa[21].

Todas las técnicas de laboratorio que se usan para aislar ADN o extraerlo en alta pureza, visualizarlo para ver su estado, cortarlo y pegarlo (nacimiento de la Ingeniería genética), amplificar una región en una enorme cantidad de moléculas (clonación de fragmentos en bacterias u otros vectores como virus y PCR), corte de una determinada región con enzimas de restricción para ver si por una mutación se gana o se pierde un sitio de restricción ,que significa: diferencias en los tamaños de los fragmentos de restricción debido a polimorfismos en el ADN entre otras. Para poder visualizar el ADN debemos recurrir a los geles de Agarosa. Una vez extraído el ADN o hecha una reacción de PCR debemos verificar que el ADN está allí.

---

[19] PITIYAGE, Geronimo. Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. En: Journal of Oral Pathology & Medicine. Vol. 38, Nov, 2009, no.10; p. 737-52.
[20] KMK, Masthani. Advanced Diagnostic Aids in Oral Cancer. En: Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. Vol. 13, 2012; p. 123-34.
[21] MICHIELS. Op. cit., p. 362-8.

Los virus como el del papiloma (VPH), Epstein-Barr y virus de inmunodeficiencia humana (VIH) entre otros, tienen la capacidad de producir inestabilidad genética, generando la aparición de lesiones que pueden transformarse en futuras neoplasias malignas.[22]

El epitelio está compuesto por una amplia proliferación celular y diferenciación de queratinocitos, que son los elementos celulares anfitriones para la infección por VPH y su replicación. Los queratinocitos son encargados de la transición de células malignas a través de la inmortalización y transformación, iniciada por la presencia de VPH de alto riesgo que con frecuencia resultará en CEC.

4.2. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN MUCOSA ORAL

Hasta marzo del 2013, se habían identificado más de 240 tipos de VPH. De estos, 25 tipos (VPH 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35, 40, 45, 52, 55, 57, 58, 59, 69, 72 y 73) han sido asociados con lesiones benignas como la hiperplasia epitelial multifocal (HEM) , la verruga vulgar (VV) y el condiloma acuminado (CA), que son las más frecuentes, lesiones premalignas y malignas, pero también se han identificado en mucosa sana[23]. La presencia de VPH en mucosa normal sugiere que el epitelio oral puede actuar como un reservorio para VPH, así como para otros virus latentes. La HEM, la VV y el CA tienen una frecuencia variable dependiendo de la población estudiada[24]. Pero se describen como lesiones elevadas con características clínicas e histopatológicas similares[25].

---

[22] Rebolledo Cobos M., Arango Fernández H., Rebolledo Cobos R., Alonso Brujes I.. Rol del virus del papiloma humano en el desarrollo de carcinoma oral: una revisión. Av Odontoestomatol [Internet]. 2016 Jun [citado 2019 Feb 21] ; 32(3): 135-144.
[23] RICHTER KL, et al.. Human papilloma virus types in the oral and cervical mucosa of HIV-positive South African women prior to antiretroviral therapy. EN: J Oral Pathol Med. 2008 October, vol.37, no.9, p. 555-9.
[24] PATHAK KA, et al. Cancer of the buccal mucosa: a tale of two continents. En: Int J Oral Maxillofac Surg. 2009 February, vol.38, no.2, p. 146-50
[25] PEREZ-SAYANS M, et al. Genetic and molecular alterations associated with oral squamous cell cancer. En: Oncol Rep. 2009 December, vol.22, no.6, p. 1277-82.

4.3. DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN Y LESIONES DE VPH EN BOCA

La detección de ADN del virus no es suficientemente específica para determinar el papel causal del virus en el cáncer. La detección de ADN viral en un cáncer en el cual el virus no es causa necesaria, sino que existen otros factores de riesgo, puede tener dos significados:

a) Tratarse de una infección transitoria: infección en fase replicativa en la que la infección viral no cuenta con un papel carcinogénico relevante.
b) Tratarse de una infección con papel oncogénico: la infección viral promueve alteraciones a nivel de la célula huésped que inducen los cambios fenotípicos correspondientes al proceso tumoral.

Es necesario establecer estrategias y algoritmos diagnósticos suficientemente sensibles, específicos, reproducibles y de fácil manejo a nivel clínico, con la finalidad de detectar infecciones por VPH clínicamente relevantes. Este hecho adquiere gran relevancia ya que la detección de VPH con actividad oncogénica en carcinomas en boca podría ser utilizada en un futuro como herramienta de clasificación diagnóstica, pronostica y de decisión terapéutica.

Si bien existe un consenso creciente en cuanto a la necesidad de llevar a cabo una determinación rutinaria de la infección por VPH para todos los pacientes con cáncer oral, no existe tal consenso en la técnica de análisis a emplear.

Las estrategias de detección varían no sólo en cuanto a la técnica a utilizar, sino también en relación al objeto a determinar. Entre las dianas a detectar se encuentran el ADN o ARN viral, oncoproteínas virales, proteínas celulares o anticuerpos séricos específicos. Los métodos de detección pueden variar ampliamente en función de los laboratorios, reflejando los sesgos y preferencias de

los investigadores, así como la relación coste-eficacia de cada una de las técnicas empleadas[26]. La siguiente figura esquematiza el proceso carcinogénico promovido por el VPH: la infección inicial, integración en el genoma huésped, transcripción de mARN E6/E7 viral, translación en oncoproteínas virales, y alteración de la expresión de proteínas celulares incluyendo la sobreexpresión de p16. Cada uno de estos procesos puede ser evaluado mediante diferentes técnicas de laboratorio que se emplean en la detección de la infección VPH en los pacientes con carcinomas o lesiones malignas en boca.

5. METODOLOGIA PROPUESTA

5.1. TIPO DE ESTUDIO

Este es un estudio de tipo descriptivo de corte transversal con un enfoque cuantitativo cuyo objetivo es identificar la presencia del virus de papiloma humano (VPH) en desordenes potencialmente malignos y cáncer oral en pacientes de diversos grupos sociodemográficos en la ciudad de Cartagena y barranquilla.

Considerando que un periodo de 6 meses sea evaluado alrededor de 70 pacientes para obtener una muestra final de 20 pacientes que deben presentar desordenes potencialmente malignos como leucoplasia, leucoeritroplasia, acantosis, palatinitis, liquen plano, eritroplasia, queilitis actínica, fumador invertido.

5.2. MUESTRA

El tamaño de la muestra será determinado por conveniencia, este estudio se realizará a través de la evaluación clínica de los pacientes que asistan a la facultad de odontología de la universidad de Cartagena y en el área de patología del Hospital Universitario, como también pacientes evaluados en la universidad Metropolitana de la ciudad de Barranquilla en donde los pacientes estudiados deben presentar Desordenes potencialmente malignos.

La selección de los participantes se realizará de manera no probabilística teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión.

5.2.1. Criterios de inclusión

- Sujetos de cualquier género y mayores de 18 años
- Sujetos que presentaron lesión en cavidad oral clasificada como potencialmente malignas según la organización mundial de la salud (OMS) del año 2014.

Tabla 1. Lesión y condición precancerosa.

Lesión Precancerosa	Condición precancerosa
Leucoplasia	Fibrosis submucosa
Eritroplasia	Queratosis actínica
Lesión palatina de fumador inverso	Liquen plano
Vasculitis	Lupus eritematoso discoide

5.2.2. Criterios de exclusión

- Sujetos que se encontraron en embarazo o lactancia
- Sujetos portadores de VIH-SIDA
- Sujetos con enfermedad autoinmune
- Sujetos que recibieron tratamiento para la neoplasia (quimioterapia o radioterapia)**.**

5.2.3. Recolección de datos

En la recolección de datos se realizará una historia clínica exhaustiva en donde se deje claro los hábitos y vicios que presente el paciente; así como la implementación de relaciones sexuales modificadas, del mismo modo se empleará un consentimiento informado explicito donde quede evidenciado el bajo riesgo del estudio.

A su vez se hará examen estomatológico intra.
Cuando se tengan seleccionados los diagnósticos presuntivos se harán biopsia para identificarlos tales como (tipo de biopsia)

6. INSTRUMENTOS Y VARIABLES

6.1. ANALISIS HISTOPATOLOGICO

Los patólogos determinan su diagnóstico mediante:

Tabla 2. Análisis Histopatológico.

	Neoplasia intraepitelial escamosa (SIN)	Ljubljana - clasificación de lesiones escamosas intraepiteliales (SIL)
Hiperplasia de células escamosas		Hiperplasia de células escamosas
Displasia leve	SIN 1	Hiperplasia de células basales y parabasales*
Displasia moderada	SIN 2	Hiperplasia con atipia celular**
Displasia severa	SIN 3***	Hiperplasia con atipia celular**
Carcinoma in-situ	SIN 3***	Carcinoma in-situ
* Los cambios hiperplásicos de células Basal y Parabasal se encuentra dentro de la clasificación de lesiones benignas, pero se considera como precursora de lesiones displásicas leves.		
** El riesgo aumenta análogamente entre la displasia moderada y la severa.		
*** Se debe considerar como una Neoplasia intraepitelial de células escamosas		

6.1.1. Extracción de ADN

Una vez realizada la histopatología se procede a realizar la extracción de ADN de los bloques de la siguiente manera:

Primero, 5 a 10 cortes de 10-µm de espesor (dependiendo del tamaño del tejido) se colocarán en tubos Eppendorf de 1.5-ml para la extracción del ADN. Para prevenir

la contaminación cruzada de las muestras, cada bloque se cortará con una cuchilla independiente. La extracción de AND se llevará a cabo con minikit QiaAmp DNA DNA (Qiagen) y las apropiadas columnas de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La calidad del ADN (260/280nm) y la concentración (260 nm) se determinará en Nanodrop y electroforesis en geles de agarosa al 2% amplificando una secuencia de 171 pb del gen b-actina.

6.1.2. Identificación de VPH y genotipificación

Se realizará la detección de VPH por PCR convencional en las muestras embebidas en parafina con la finalidad de determinar a cuáles de ellas se les realiza la tipificación múltiplex. Para esto, se utilizará un par de cebadores universales para el virus llamado “cebadores consenso”. La secuencia consenso que se utilizará será la MY09-MY11 la cual contiene varios nucleótidos degenerados los cuales reconocen la región L1 conservada del virus y es común para los diferentes tipos virales. Las reacciones de amplificación se realizarán en un volumen final de 25 µl y se realizarán utilizando 1× Taq, 0.5 µM de cada cebador, 3 µM de MgCl2 y 5 µl ADN de las muestras. La PCR se realizará utilizando las siguientes condiciones de ciclaje: 3 min 95°C; 35 cicles de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s, y 72°C por 90 s; con una elongación final de 7 min a 72°C. La calidad de amplificación de la muestra de ADN será validada por la amplificación de un fragmento de 286-pb del gen housekeeping β-globina y electroforesis en 2% de agarosa.

6.1.3. Genotipificación

Se genotipificaron los VPH tipo 16, 18, 31 y 45.
Todos los productos de PCR serán sometidos a una electroforesis en gel de agarosa 1,5%, bajo luz ultravioleta con Syber Safe.

Tabla 3. Genotipificación.

Genotipo de VPH	Secuencia de cebadores
16	L1F=GACCCAGAAAGTTACCACAG L1R=CACAAGGGTTTGTGTATTG
18	L1F=GGCTTCACACTTACAACACA L1R=AAGAAAACGATGAAATAGATG
31	L1F=GATGAGGTGGTGGGTGTAGC L2R=GGGAGGTGTGGTCAATCC
45	L1F=TAATTTAACATTATGTGCCTC L1R=CCAACAGCAAGCAACCTAGA

7. ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados serán centralizados en una base de datos de Excel para su posterior análisis. Se sacarán las frecuencias absolutas y relativas de la presencia de cada genotipo en estudio. Se sacarán medidas de razón de prevalencia e intervalos de confianza para las variables demográficas incluyendo región, edad y género y para

el diagnóstico histopatológico en relación con la presencia de los diferentes genotipos evaluados de VPH. Se comparará la carga viral entre los diferentes grupos de diagnóstico histopatológico con una prueba de ANOVA. En caso de no seguir la distribución normal se realizará estadística no paramétrica. Análisis post hoc serán realizados para comparación entre grupos. Todas las pruebas se realizarán con un nivel de significancia del 5%.

7.1. VARIABLES Y OPERALIZACIÓN

Tabla 4. Variables y Operalización.

VARIABLES	DIMENSIÓN	CÓDIGOS
Características Sociodemográficas	Edad	N/A
	Sexo	0: Masculino 1: Femenino
	Lugar de nacimiento	N/A
	Residencia	N/A
	Ocupación actual	N/A
	Estado civil	1: Soltero 2: Casado 3: Separado 4: Divorciado 5: Unión libre 6: Viudo 7: Otro
	Pareja estable	0: Si 1: No
	Nivel de educación	1: Primaria completa 2: Primaria incompleta 3: Secundaria completa

		4: Secundaria incompleta 5: Técnica completa 6: Técnica incompleta 7: Profesional completa 8: Profesional incompleta
	Nivel de ingresos familiares	1: Menos de 2 salarios mínimos 2: Entre 2 y 6 salarios mínimos 3: Más de 7 salarios mínimos
Antecedentes Médicos	Enfermedad diagnosticada	0: No 1: Si
	Cáncer diagnosticado	N/A
	Formulación de medicamentos	0: No 1: Si
Hábitos y Vicios	Fumador	1: Si 2: No 3: Ocasional 4: Lo dejó hace menos de 6 meses
	Tiempo de fumar	1: De 6 meses a 1 año 2: De 2 a 10 años 3: Más de 10 años
	Consumo de cigarrillo	1: Menos de 10 al día 2: Entre 10 y 20 al día 3: Más de 20 al día
	Exposición a humo de cigarrillo	0: No 1: Si

	Consumo de bebidas alcohólicas	1: Todos los días 2: Al menos 1 vez por semana 3: Ocasional 4: Nunca
	Bebidas alcohólicas	1: Cerveza 2: Vino 3: Bebidas fuertes: ron, aguardiente, whisky, vodka
	Tiempo de consumo	1: Antes de los 20 años 2: Después de los 20 años 3: Nunca
	Frecuencia de consumo	1: Menos de 5 tragos al día 2: Más de 5 tragos al día 3: En menor proporción que lo anterior
VPH y Diagnóstico Clínico	Vacuna contra el VPH	1: Si 2: No 3: No sabe
	Edad de vacunación	0: Antes de los 20 años 1: Después de los 20 años
	Pareja diagnosticada con VPH	1: Si 2: No 3: No sabe
	Signos y síntomas	1: Sangrado de encías 2: Absceso o pus en encías 3: Movilidad dentaria

		4: Pérdida de dientes por aflojamiento
	Características clínicas	1: Una úlcera 2: Mancha blanca 3: Mancha roja 4: Una masa 5: Dolor que no se asocie a ningún diente 6: Cambio de voz 7: Dificultad para hablar 8: Dificultad para tragar 9: Ninguna de las anteriores
Diagnóstico de Biopsia y Citología	Detección de VPH	0: Negativo 1: Positivo

8. RESULTADOS

Se tomaron 47 pacientes de las cuales el mayor porcentaje fue en el sexo femenino con 41 pacientes que equivale al (87,2%) y del sexo masculino fueron 6 pacientes

que equivalen al (12,8%). El diagnostico predominante fue paladar del fumador invertido con 33 pacientes que equivale al (70,2%) seguida de liquen plano y queilitis actinica con 3 pacientes que equivale a (6,4%) cada una. En cuanto a la localización el más predominante fue paladar y lengua con 27 pacientes que equivale al (57,4%) seguida de labios y lengua con 5 pacientes que equivalen al (10,6%). En cuanto a la raza la más predominante fue la raza negra con 43 pacientes que equivale al (91,5%) seguida del mestizo con 4 pacientes que equivale al (8,5%) y en cuanto a la ocupación la más predominante fue ama de casa con 26 pacientes que equivale al (55,3%) (Tabla 1). Referente a la edad su media fue de (60,21) (Grafica 1).

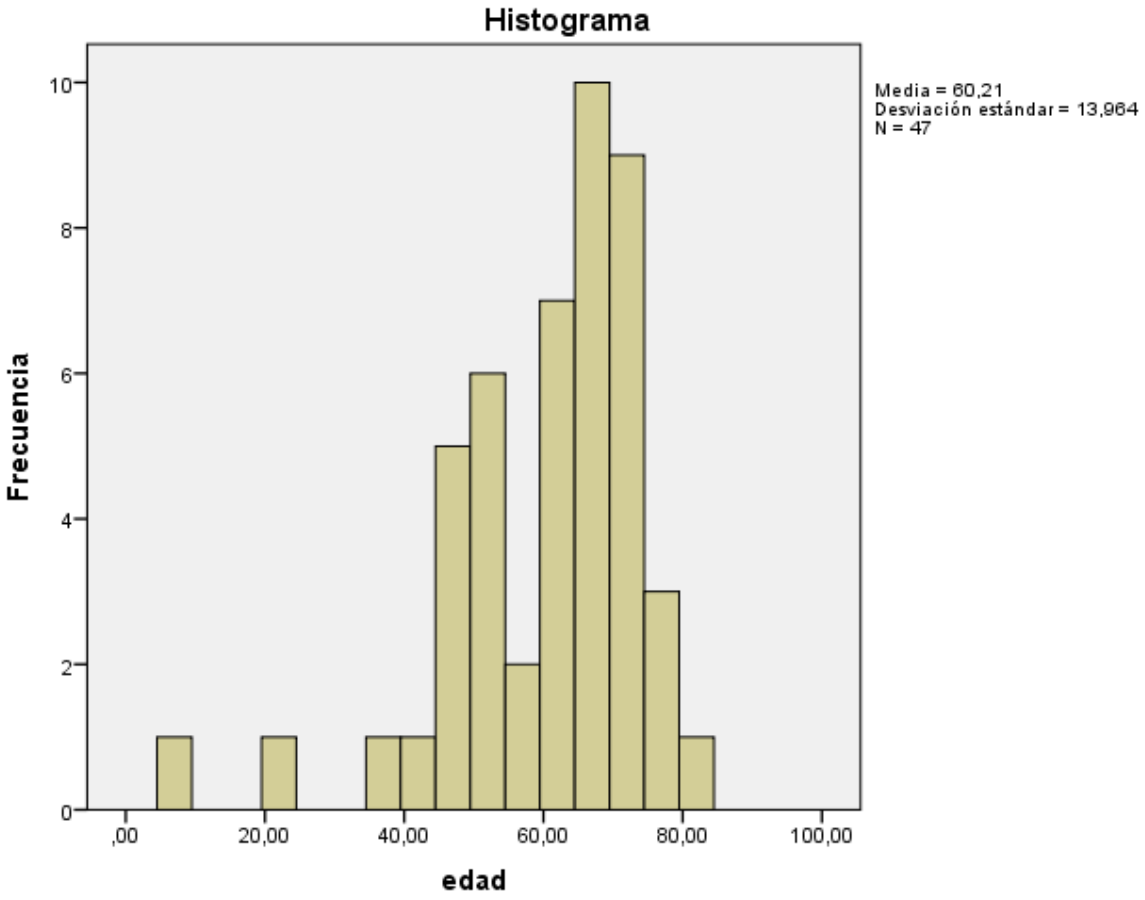
Existe asociación estadísticamente significativa entre raza y diagnóstico (p= 0,004) y entre localización y diagnostico (p=0,005).

Tabla 5. Frecuencia y porcentaje de las lesiones.

		frecuencia	porcentaje
sexo	masculino	6	12,8
	femenino	41	87,2

diagnostico	leucoplasia	2	4,3
	queilitis actínica	3	6,4
	liquen plano	3	6,4
	paladar del fumador invertido	33	70,2
	melanosis del fumador	1	2,1
	leucoplasia verrugosa	1	2,1
	carcinoma escamocelular	1	2,1
	leucoedema	2	4,3
	eritoplasia	1	2,1
localización	paladar y lengua	27	57,4
	labios y comisura	1	2,1
	paladar y mucosa yugal	3	6,4
	labios	5	10,6
	lengua	5	10,6
	encía	2	4,3
	reborde alveolar	4	8,5
raza	negro	43	91,5
	mestizo	4	8,5
	indígena	0	0
	blanco	0	0
ocupación	conserje	16	34
	ama de casa	26	55,3
	pescador	5	10,6

Grafica 1. Histograma.



9. DISCUSIÓN

El virus del papiloma humano (VPH) está asociado con una variedad de lesiones benignas y malignas, entre éstas últimas se encuentran los de la mucosa oral. Su conocimiento es importante para la determinación, prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la patología .Dentro de los factores que se identifican asociados al cáncer oral están el tabaco y el alcohol. Sin embargo en los últimos años se ha evidenciado la implicación del VPH como un factor determinante en el desarrollo de lesiones pre malignas y de cáncer oral.

Se estudiaron 47 pacientes en un periodo de 10 meses de los cuales 41 eran del sexo femenino y 6 del sexo masculino observándose de las muestras que el mayor porcentaje fue en el sexo femenino que equivale al (87,2%);resultados similares son presentados por Jimenez (2008) en donde la mayor incidencia de las lesiones se presento en el sexo femenino (90%) con respecto al masculino (10%) pero difieren de los resultados de Mravak-Stipeticy cols cuyo estudio se presentó significativamente mas lesiones potencialmente malignas en hombres.

En este estudio con respecto a la edad se evaluaron sujetos entre los 7 y 80 años, siendo los del grupo de edad entre 60 y 80 años donde más prevaleció la presencia de las lesiones. Padoyochee (2004) señalo que la prevalencia de las infecciones se observa más entre la primera y la segunda década de vida (11). Observando estos datos podemos evidenciar que en nuestra actualidad es frecuente que las personas presenten diversos hábitos malignos para su salud, teniendo en cuenta que cuentan con el conocimiento y herramientas que demuestran lo perjudicial que estos pueden llegar hacer, mas sin embargo no existen significativos cambios en el actuar que ayuden a mejorar la incidencia de estas lesiones potencialmente malignas y con ellas evitar su malignizacion.

El diagnostico predominante fue paladar del fumador invertido que equivale al (70,2%) seguida de liquen plano y queilitis actinica que equivale a (6,4%) cada una;esto nos permite establecer la importancia de conocer cada una de las lesiones potencialmente malignas para poder diferenciarlas al momento su evaluación clínica y diagnosticarlas acertadamente y mostrar su incidencia.

En cuanto a la localización el más predominante fue paladar y lengua que equivale al (57,4%). Jiménez (2008) y Terai y cols. (2009) reportaron la prevalencia de estas lesiones son más frecuentes en labio inferior. Costa y cols. (2008) reportaron en su estudio la localización más frecuente para penetración del VPH en lesiones potencialmente malignas fue bordes laterales de la lengua y carrillos. Esto nos permite analizar que aunque diversos estudios muestran que la localización varia indistintamente lo cierto es que sea cual sea el lugar donde se presente estas lesiones la probabilidad de que se malignicen es igual en todas y más aún cuando se está en compañía del virus del vph.

En cuanto a la raza la más predominante fue la raza negra con un (91,5%) y en cuanto a la ocupación la más predominante fue ama de casa. Estos datos resultan realmente paradójicos pues no creeríamos que una ama de casa sería más propensa a presentar estas lesiones más sin embargo debemos tener en cuenta que en el pasado abuelas y madres dueñas de hogar se dedicaban a realizar sus labores empleando el fumar invertido tradiciones que podrían pasar de generación en generación; a su vez el estar expuesta al sol e incluso la poca asistencia a evaluaciones clínicas tanto medicas como odontológicas ,es por esto que todos estos factores pueden conllevar a su predispodencia.

Es cierto que algunos diagnósticos particulares están más asociados con la presencia de VPH, sin embargo, estos datos muestran que la topografía de la lesión se asocia significativamente a la frecuencia de VPH de una lesión particular. Una de las posibles explicaciones de los datos observados es que los lugares con mayor penetración por VPH (paladar y lengua) son también los sitios más expuestos a micro traumas que es requisito previo para la transmisión de la infección por el VPH.

10. CONCLUSIONES

Para concluir sin duda, es cierto que algunos diagnósticos particulares están más asociados con la presencia de VPH, sin embargo, estos datos muestran que la topografía de la lesión se asocia significativamente a la frecuencia de VPH de una lesión particular. Una de las posibles explicaciones de los datos observados es que los lugares con mayor penetración por VPH (paladar y lengua) son también los sitios más expuestos a micro traumas que es requisito previo para la transmisión de la infección por el VPH.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1.SYRJÄNEN, Shkodran y SYRJÄNEN, Karl. The history of papillomavirus research. En: Central European Journal of Public Health. Vol. 16, Aug, 2008; p.137.

2.MÜNGER, Kurt y HOWLEY, Paul. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. En: Virus Research. Vol. 89, Nov, 2002; p. 213-28.

3.RAHKOLA, Pione. Association between high risk papillomavirus DNA and nitric oxide release in the human uterine cervix. En: Gynecologic Oncology. Vol. 114, Aug, 2009, no.2; p.323-6.

4.INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA. Anuario estadístico 2009. Bogotá: Impresos en Buenos y Creativos S.A.S. Vol. 7, Sep, 2011. p. 26-8.

5.DELIGEOROGLOU, Eric. HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy. En: Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology. Vol. 67, Feb, 2005; p. 250-6.

6.BRAGA RIBEIRO, Karina. Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: results from two large case–control studies in high-incidence regions. En: International Journal of Epidemiology. Vol. 40, 2011; p.489–502.

7.MAROCCHIO. Op. cit., p.267-73.

8.ESTRADA PEREIRA, Guillermo. Infección por virus del papiloma humano en la cavidad bucal. En: Medisan.

Vol. 19, Jun, 2015; p. 300-6.

9.CHÁIREZ ATIENZO, Pedro. Presencia del Virus Papiloma Humano en la Cavidad Oral: revisión y Actualización de la Literatura. En: International Journal of Odontostomatology. Vol. 9, Jul, 2015; p. 233-8.

10.Rebolledo Cobos M., Arango Fernández H., Rebolledo Cobos R., Alonso Brujes I.. Rol del virus del papiloma humano en el desarrollo de carcinoma oral: una revisión. Av Odontoestomatol [Internet]. 2016 Jun [citado 2019 Feb 21] ; 32(3): 135-144.

11.KUMAR, Rafik. Alcohol and tobacco increases risk of high risk HPV infection in head and neck cancer patients: study from North-East Region of India. En: PloS one. Vol. 10, 2015; p. 10-5.

12.BROUWER, AF, et al. Age effects and temporal trends in HPV-related and HPV-unrelated oral cancer in the United States: a multistage carcinogenesis modeling analysis. En: PloS one. Vol. 11, 2016; p.115-9.

13.SARDUY NÁPOLES, Martín. Correlación citohistológica en las neoplasias intraepiteliales cervicales y en la identificación del VPH en esas lesiones. En: Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología. Vol. 35, 2009; p. 24-7.

14.MICHIELS. Op. cit., p. 362-8.

15.SCARDINA, Angelo, PISANO, Tony y MESSINA, Paolo. Oral and cervical lesions associated with human papillomavirus. En: Recenti Progressi in Medicina. Vo. 100, May, 2009; p.261-6.

16.ORTHOLAN, Cecil. Oral cavity squamous cell carcinoma in 260 patients aged 80 years or more. En: Radiotherapy and Oncology. Vol. 93, Dic, 2009, no.3; p. 516-23.

17.RANKIN, Kevin. Oral health in cancer therapy. En: Texas Dental Journal. Vol. 126, May, 2009, no.5; p. 389-97.

18. MICHIELS. Op. cit., p. 362-8.

19. PITIYAGE, Geronimo. Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. En: Journal of Oral Pathology & Medicine. Vol. 38, Nov, 2009, no.10; p. 737-52.

20. KMK, Masthani. Advanced Diagnostic Aids in Oral Cancer. En: Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. Vol. 13, 2012; p. 123-34.

21. MICHIELS. Op. cit., p. 362-8.

22. Rebolledo Cobos M., Arango Fernández H., Rebolledo Cobos R., Alonso Brujes I.. Rol del virus del papiloma humano en el desarrollo de carcinoma oral: una revisión. Av Odontoestomatol [Internet]. 2016 Jun [citado 2019 Feb 21] ; 32(3): 135-144.

23. RICHTER KL, et al.. Human papilloma virus types in the oral and cervical mucosa of HIV-positive South African women prior to antiretroviral therapy. EN: J Oral Pathol Med. 2008 October, vol.37, no.9, p. 555-9.

24. PATHAK KA, et al. Cancer of the buccal mucosa: a tale of two continents. En: Int J Oral Maxillofac Surg. 2009 February, vol.38, no.2, p. 146-50

25. PEREZ-SAYANS M, et al. Genetic and molecular alterations associated with oral squamous cell cancer. En: Oncol Rep. 2009 December, vol.22, no.6, p. 1277-82.

26. SYRJÄNEN, Shkodran y SYRJÄNEN, Karl. The history of papillomavirus research. En: Central European Journal of Public Health. Vol. 16, Aug, 2008; p. 13-

27.MÜNGER, Kurt y HOWLEY, Paul. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. En: Virus Research. Vol. 89, Nov, 2002; p. 213-28.

28. RAHKOLA, Pione. Association between high risk papillomavirus DNA and nitric oxide release in the human uterine cervix. En: Gynecologic Oncology. Vol. 114, Aug, 2009, no.2; p.323-6.

29. PALACIO, D. Rada C.; MURILLO, R. Instituto Nacional de Cancerología Anuario Estadístico Año 2008. Bogotá, DC: sn, 2009, p. 28-42.

30. INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA. Anuario estadístico 2009. Bogotá: Impresos en Buenos y Creativos S.A.S. Vol. 7, Sep, 2011. p. 26-8.

31. DELIGEOROGLOU, Eric. HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy. En: Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology. Vol. 67, Feb, 2005; p. 250-6.

32. KUMARASWAMY KL and VIDHYA M. Human papilloma virus and oral infections: an update. EN: J Cancer Res Ther. Apr-Jun, vol.7, no.2, p. 120-7

33. VIETÍA, Dayahindara, et al. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinoma. *ecancermedicalscience*, 2014, vol. 8.

34. MRAVAK-STIPETIĆ, Marinka, et al. Human papillomavirus in the lesions of the oral mucosa according to topography. *PloS one*, 2013, vol. 8, no 7, p. e69736.

35. STOJANOV, Ivan J.; WOO, Sook-Bin. Human papillomavirus and Epstein–Barr virus associated conditions of the oral mucosa. En *Seminars in diagnostic pathology*. WB Saunders, 2015. p. 3-11.

36. D'COSTA, Jenice, et al. Detection of HPV-16 genome in human oral cancers and potentially malignant lesions from India. *Oral oncology*, 1998, vol. 34, no 5, p. 413-420.

37. LOSI-GUEMBAROVSKI R, et al. Oral carcinoma epidemiology in Parana State, Southern Brazil. EN: Cad SaudePublica. 2009 February, vol.25, no.2, p.393- 400. 66.

38. MAYNE ST, et al. Alcohol and tobacco use prediagnosis and postdiagnosis, and survival in a cohort of patients with early stage cancers of the oral cavity, pharynx, and larynx. EN: Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009 December, vol.18, no.12, n. 3368-74.

39. PATRICK K. HA, et al. Real-Time Quantitative PCR Demonstrates Low Prevalence of Lesions of the Oral Cavity Human Papillomavirus Type 16 in Premalignant and Malignant Lesions of the Oral Cavity. EN: ClinCancer Res. 2002, vol,8, p.1203-1209.

40. QUINTERO KATERIN, ET AL. Human papillomavirus types in cases of squamous cell carcinoma of head and neck in Colombia. EN: Brazilian Journal of Otorhinolaryngology. 2013 MAY/JUNE. Vol. 79, no. 3, p. 375-81

41. RAMÍREZ-AMADOR, MA, et al. High association of human papillomavirus infection with oral cancer:a case-control study. EN: Arch Med Res. 2008, vol.39, p. 189- 197.