

**PREVALENCIA Y SEROTIPOS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN
CORTES HISTOPATOLOGICOS DE PACIENTES CON CARCINOMA ORAL EN
UN HOSPITAL DE LA CIUDAD DE CARTAGENA DE INDIAS ENTRE 2007-
2011**

Investigadores principales:

ROSA BALDIRIS

MARTHA CARMONA LORDUY

ROCIO VERGARA GONZALEZ

Coinvestigadores

Dra. Sandra Perdomo

Dr. Adel Martínez

Dr. Yezid Berben Cantero

Dr. Cesar Redondo

ROSSANA LOPEZ SALEME

Asesora Metodológica

NOTA DE ACEPTACION

FIRMA DEL PRESIDENTE DEL JURADO

FIRMA DEL JURADO

FIRMA DEL JURADO

CIUDAD Y FECHA (DIA, MES, AÑO)

AGRADECIMIENTOS

A DIOS TODOPODEROSO

Por las maravillosas Bendiciones que me envía cada día.

A mi esposo Yezid.

Que con todo su amor incondicional y comprensión iluminó éste camino dándome Fortaleza, Esperanza y Alegría.

A mi hija María Rocío

Porque con su valiosa Compañía inundada de inocencia animó los pasos más difíciles que atravesé.

A mi madre

Quien desde el Cielo me sigue tomando de su mano y no me dejo caer.

A mi padre

Porque con su Sacrificio, amor y ejemplo me guió hacia el verdadero significado de las cosas.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	8
1. INTRODUCCION	10
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
3. OBJETIVOS	16
3.1 OBJETIVO GENERAL	16
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
4. MARCO TEORICO	17
5. METODOLOGIA	37
5.1 TIPO DE ESTUDIO	37
5.2 POBLACION Y MUESTRA	37
5.2.1 Criterios de inclusión	37
5.2.2 Criterios de exclusión	38
5.3 VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN	38
5.4 PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCION DE DATOS	39
6. RESULTADOS	45

7. DISCUSION	54
8. CONCLUSIONES	61
9. RECOMENDACIONES	61
BIBLIOGRAFIA	62
ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Número de casos según el año	45
Tabla 2. Características clínicas y patológicas de las muestras evaluadas	46
Tabla 3. Concentración y pureza de muestras de DNA obtenidas	48

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ubicación del carcinoma en cavidad oral	47
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % productos amplificados de PCR con los primers PCO3/PCO4 (tamaño del amplicón: ~170 pb).	49
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % productos amplificados de PCR con los primers PCO3/PCO4 (tamaño del amplicón: ~170 pb).	50

RESUMEN

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es considerado como un factor etiológico para el Carcinoma de Cuello uterino y su asociación con Carcinomas Orales y Orofaringeos han sido recientemente abordados. En algunos países desarrollados se ha observado un aumento en la incidencia del cáncer oral y Orofaringeos particularmente en adultos jóvenes sin hábitos de fumador ni consumo de alcohol, contrario a la disminución, que se ha observado en la tasa de incidencia de las 2 últimas décadas, de este tipo de canceres en correspondencia con la disminución en el consumo de tabaco. Diferentes investigaciones han reportado que el VPH puede jugar un papel en el desarrollo de carcinomas de cabeza y cuello y pueden tener un impacto en el pronóstico. Sin embargo resultados inconsistentes respecto a la prevalencia del virus se han obtenido hasta el momento. El origen del sitio de las muestras, el tamaño, los métodos de detección, el tamaño o las diferencias poblacionales pueden explicar estas discrepancias. El riesgo de infección por el Virus del Papiloma humano relacionadas con el sexo oral constituye la primera causa de Cáncer Oral en algunos países, superando de esta forma al hábito de fumar tabaco como causa de esta enfermedad.

Objetivo: Determinar la prevalencia y los serotipos del VPH sobre bloques de parafina de pacientes diagnosticados con Carcinoma Escamocelular Oral a través de PCR.

Método: Estudio Descriptivo de corte Transversal, Retrospectivo, utilizando bloques de parafina de pacientes diagnosticados con Cáncer Oral, con

identificación molecular mediante PCR para la tipificación del virus en el periodo de tiempo comprendido entre años 2007 al año 2011.

Resultados: De las 15 muestras parafinadas el 40% corresponden al sexo femenino y el 60% al sexo masculino, con mayor ubicación del Tumor en el paladar y en el 100% de las muestras no hubo presencia de VPH.

Conclusión: No existe prevalencia del VPH en las muestras de los pacientes con diagnóstico de Carcinoma Escamocelular Oral

Palabra claves: Neoplasias de la boca, papillomavirus humano16 , Papillomavirus humano 18, Reacción de Cadena Polimerasa (DeCS)

1. INTRODUCCION

El Cáncer de Células Escamosas o Epidermoide de Cavidad Oral, comienza en las células (escamosas) que revisten la piel y las vías respiratorias y digestivas superiores. Comprende el 4-5% de todos los cánceres del organismo y el 90% de todos los Cánceres de la cavidad Oral. La relación causa – efecto del virus del papiloma humano en el cáncer bucal sigue siendo estudiada, pudiendo desempeñar un activo papel en su iniciación.

El virus del papiloma humano (HPV) es un virus ADN, con epiteliotrofismo y ha sido analizado por métodos sofisticados como los de biología molecular. Los virus ADN oncogénicos se dividen en tres grupos, los Papovavirus incluyendo al HPV, los Adenovirus y los Herpesvirus.

De éstos grupos virales mencionados es tema de la presente investigación los HPV de Mayor potencial oncogénico: los tipos 16 y 18; de los cuales se determinará su presencia en los cortes histopatológicos parafinados de pacientes diagnosticados con Cáncer Oral de un hospital de la ciudad de Cartagena en los años 2007 al 2011, mediante la técnica de la Reacción en Cadena Polimerasa.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los Carcinomas son un tipo de tumor canceroso procedentes de la capa de revestimiento (células epiteliales) de un órgano. Alrededor del 80 por ciento de todos los cánceres son carcinomas. Los tumores de la Cavidad Oral y Orofaringe pueden ser Epiteliales, Mesenquimales, o Hematolinfoides. Los Epiteliales pueden ser clasificados como los que se originan en el epitelio de revestimiento de la cavidad Oral y Orofaringe y los derivados de tejido de las glándulas salivales .

El Tabaquismo es el factor de riesgo más importante para Cáncer Oral; en el humo inspirado del tabaco existen más de 30 carcinógenos; los más importantes son los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las nitrosaminas¹. El riesgo de cáncer es directamente proporcional a la cantidad de tabaco consumido. Respecto al consumo de alcohol, asociado también al incremento del riesgo de padecer Cáncer Oral, presenta como mecanismos conocidos de la carcinogénesis las deficiencias nutricionales e hipovitaminosis, factores metabólicos, deficiencia de células T y de su actividad mitótica, irritación local, disminución de la acción protectora de la saliva, potencialización y solvencia de los carcinógenos del tabaco, lo que promueve su penetración en la mucosa, desregulación del sistema enzimático del citocromo p450,14 enzima que favorece el cambio de procarcinógeno a carcinógeno, disminuye la actividad de enzimas reparadoras del ADN, incrementa el daño cromosómico y los niveles séricos de acetaldehído. Así mismo, la dosis de alcohol consumido tiene una relación directamente proporcional con la posibilidad de tener un cáncer Oral. Cuando existe una asociación, ésta actúa sinérgicamente en la génesis del Carcinoma Epidermoide

¹ RAHKOLA P, et al. Association between high risk papillomavirus DNA and nitric oxide release in the human uterine cervix. EN: Gynecol Oncol. 2009 Aug. vol, 114, no.2, p.323-6.

de la Orofaringe e incrementa hasta 50% el riesgo de padecer Cáncer Oral en comparación con la población sin este tipo de asociación² .

Así mismo la infección por el VPH también se reporta asociado con la etiología del Cáncer Oral; más de 80 diferentes tipos de virus del papiloma humano han sido identificados y existe evidencia de que al menos otras 40 variedades podrían ser clasificadas; los diferentes tipos de VPH no solo se diferencian por la morfología de las lesiones que producen, sino también por su posible potencial oncogénico. Estos virus tienen especial tropismo por los epitelios de células escamosas y su ciclo productivo es mantenido sólo por las células epiteliales; en un epitelio infectan las células basales encargadas de la síntesis de ADN, en donde inician su replicación. Bonnez y otros autores agrupan a los de mayor riesgo oncogénico a los tipos 16 y 18, siendo éstos los tipos virales más asociados a cáncer Oral. El papel que juegan determinado tipos de dicho virus en la oncogénesis está claramente establecido en las lesiones genitales, no así en otras localizaciones como la Cavidad oral³ .

Por lo tanto se ha suscitado un interés por identificar cual o cuales de estos tipos son los más frecuentemente implicados en las lesiones malignas de la Cavidad Oral. La infección del VPH tiene relación con los hábitos sexuales de los individuos y ha sido demostrado que la frecuencia de ésta infección es mayor en personas con múltiples contactos sexuales sin protección, y con el contacto orogenital, anogenital y oroanal; la identificación de VPH en la orofaringe de parejas de pacientes con neoplasia intraepitelial cervical asociada al virus, es

² HWANG LY, et al. Factors that influence the rate of epithelial maturation in the cervix in healthy young women. EN: J Adolesc Health. 2009 Feb. vol.44. no.2, p.103-10

³ BOSCH FX, DE SANJOSE S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. EN: Dis Markers. 2007, vol.23, no.4. p. 213-27

mayor que en aquéllas en las que el virus no se identifica; la presencia del virus del papiloma humano podría ser la causa del incremento en el número de pacientes con cáncer de lengua-orofarínge que no fuman ni beben alcohol y en menores de 45 años de edad, en contraposición a lo ya conocido respecto a que el Cáncer Oral ocurre en adultos que utilizan el alcohol y el tabaco en la quinta y sexta década de la vida⁴. Las Lesiones pequeñas son a menudo asintomáticas, o pueden presentar síntomas vagos. Por otro lado las lesiones avanzadas que se encuentran a nivel local usualmente se presentan con dolor, halitosis, y dificultad con el habla, deglución, y masticación⁵. Estas asociaciones mencionadas destacan la importancia de la detección, distinción y cuantificación de las infecciones por VPH de bajo riesgo y de riesgo oncogénico, para el seguimiento, tratamiento y progresión de la enfermedad (18^a).

Es cierto que la relación causa-efecto del VPH continúa siendo estudiada, por ello la investigación pretende determinar si en cortes histopatológicos de pacientes diagnosticados con Cáncer Oral existe alguna prevalencia de Virus Papiloma Humano y de cual tipo (16 y 18) o tipos son los más frecuentemente implicados en ello, utilizando para tal fin la técnica de Reacción en Cadena Polimerasa (PCR), lo que nos permite incluir las infecciones producidas por el virus como factor etiológico del Cáncer Oral, haciendo que situaciones demográficas tales como niveles bajos de educación, de pobreza, y estilos de vida que incluyen las prácticas sexuales, se empiecen a considerar como factores de riesgo para su aparición.

Aproximadamente 570.000 nuevos casos de Carcinoma Escamocelular de Cabeza y Cuello son diagnosticados anualmente alrededor del mundo. América

⁴ MAROCCHIO LS, et al. Oral squamous cell carcinoma: an analysis of 1,564 cases showing advances in early detection. EN: J Oral Sci. vol.52, no.2, p.267-73.

⁵ Ibid, p.267-73.

Latina y Europa central son relativamente regiones de alto riesgo para carcinoma Escamocelular de Cabeza y Cuello. Pero reportan una presencia de VPH más baja que en los estudios americanos ⁶

En Colombia la incidencia de Carcinoma Escamocelular Oral no está tan bien establecida y menos aún la relación existente entre el VPH y Cáncer 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. En un estudio transversal retrospectivo de 9 años (1999 a 2008) realizado en cuatro laboratorios de patología de Medellín, Colombia, fueron analizados 175 casos de Carcinoma Escamocelular de Cabeza y Cuello de los cuales 67 pertenecían a Cavidad Oral ⁷. Según el Instituto Nacional de Cancerología en 2009 están reportados casos nuevos de incidencia de canceres ubicados en su mayoría en Lengua, hombres entre 60 a 70 años de edad con 14 casos, y mujeres entre 80 y 88 años de edad con 14 casos. La incidencia, en el departamento de Bolívar entre 2002 y 2006, de cáncer en labios, cavidad oral y faringe en hombres fue de 34 casos anuales y en mujeres de 43 casos anuales. Aunque históricamente el cáncer de cabeza y cuello no se ha considerado como un problema de salud en nuestro medio, pero teniendo en cuenta la base científica de que su etiología recae sobre factores como el alcoholismo, tabaquismo, y asociación con la infección por Virus Papiloma Humano, el

⁶ BRAGA RIBEIRO KARINA, et al. 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. 2011, vol.40, p.489-502

⁷QUINTERO 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

incremento de estos factores hacen prever que en el futuro el número de casos se aumentara ⁸ .

Por lo anterior se hace necesario conocer: ¿Cuál es la prevalencia y serotipos del Virus del Papiloma Humano en cortes histológicos de pacientes con carcinoma oral en un hospital de la ciudad de Cartagena entre 2007-2011?

⁸ DE SANJOSE S, et al. Geographic variation in the prevalence of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus and risk factors for transmission. EN: J Infect Dis. 2009 May. Vol.199, no.10, p.1449-56

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer la prevalencia y los serotipos del VPH sobre bloques de parafina de pacientes diagnosticados con Carcinoma Escamocelular Oral a través de PCR.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Describir las características Sociodemográficas de los pacientes con diagnóstico de Carcinoma Escamocelular Oral
- Determinar la prevalencia del VPH en los bloques de parafina de pacientes diagnosticados con Carcinoma Escamocelular Oral
- Tipificar el Virus de Papiloma Humano presente -en los bloques de parafina de pacientes diagnosticados con Carcinoma Escamocelular Oral

4. MARCO TEORICO

Los Carcinomas son un tipo de tumor canceroso procedentes de la capa de revestimiento (células epiteliales) de un órgano. Alrededor del 80 por ciento de todos los cánceres son carcinomas. Los tumores de la cavidad oral y orofarínge pueden ser epiteliales, mesenquimales, o hematolinfoides. Los tumores epiteliales pueden ser clasificados como los que se originan en el epitelio de revestimiento de la Cavidad Oral y Orofaringe y los derivados de tejido de las glándulas salivales⁹ .

El Carcinoma Escamocelular es un tumor invasivo epitelial con distintos grados de diferenciación escamosa y una propensión a la temprana y extensa metástasis de ganglios linfáticos. Los principales factores que incrementan el riesgo para padecer Cáncer Oral son: Tabaquismo, Alcoholismo, asociación de ambos, infección por Virus Papiloma Humano, virus del Epstein Barr, Herpes, Inmunodeficiencia Humana. El Tabaquismo es el factor de riesgo más importante para Cáncer Oral; en el humo inspirado del tabaco existen mas de 30 carcinógenos; los más importantes son los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las nitrosaminas. El riesgo de cáncer es directamente proporcional a la cantidad de tabaco consumido¹⁰ . Respecto al consumo de Alcohol, asociado también al incremento del riesgo de padecer Cáncer Oral, presenta como mecanismos conocidos de la carcinogénesis las deficiencias nutricionales e hipovitaminosis, factores metabólicos, deficiencia de células T y de su actividad mitótica, irritación local, disminución de la acción protectora de la saliva, potencialización y solvencia

⁹ IAMAROON A and KRISANAPRAKORNKIT S. Overexpression and activation of Akt2 protein in oral squamous cell carcinoma. EN: Oral Oncol. 2009 October. Vol. 45, no.10, p.175-9

¹⁰ ISLAMI F, et al. Oesophageal cancer in Golestan Province, a high-incidence area in northern Iran - a review. EN: Eur J Cancer. 2009 December. Vol.,;45 no.18, p.3156-65

de los carcinógenos del tabaco, lo que promueve su penetración en la mucosa, desregulación del sistema enzimático del citocromo p450,14 enzima que favorece el cambio de procarcinógeno a carcinógeno, disminuye la actividad de enzimas reparadoras del ADN, incrementa el daño cromosómico y los niveles séricos de acetaldehído¹¹ . Así mismo, la dosis de alcohol consumido tiene una relación directamente proporcional con la posibilidad de tener un Cáncer Oral. Cuando existe una asociación, ésta intoxicación alcohol-tabaco actúa sinérgicamente en la génesis del Carcinoma Epidermoide de la cavidad Oral y Orofaringe e incrementa hasta 50% el riesgo de padecer cáncer Oral en comparación con la población sin esta intoxicación. El riesgo de un no bebedor que fuma 40 cigarrillos al día se multiplica por 2.5, al igual que el de un bebedor excesivo que no fuma; sin embargo, en un fumador y bebedor el riesgo relativo se multiplica por 16¹² .

Por otra parte, la infección por el VPH también se reporta asociado con la etiología del Cáncer Oral ; más de 80 diferentes tipos de virus del papiloma humano han sido identificados y existe evidencia de que al menos otras 40 variedades podrían ser clasificadas; los diferentes tipos de VPH no solo se diferencian por la morfología de las lesiones que producen, sino también por su posible potencial oncogénico. Estos virus tienen especial tropismo por los epitelios de células escamosas y su ciclo productivo es mantenido sólo por las células epiteliales; en un epitelio infectan las células basales encargadas de la síntesis de DNA, en donde inician su replicación¹³ . Bonnez ha agrupado dentro

¹¹ JUNQUERA L, et al.. Synchronous oral squamous cell carcinoma and extramedullary plasmacytoma of the tonsil. EN: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009 September. Vol,108, no.3, p.413-6

¹² Ibid, p. 413-6

¹³ JO S, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in oropharyngeal squamous cell carcinomas treated in a prospective phase II clinical trial. Anticancer Res. 2009 May. vol, 29, no.5, p.1467-74.

de los de mayor riesgo oncogénico a los tipos 16 y 18, siendo estos los tipos virales más asociados a cáncer Oral , sin embargo el papel que juegan determinado tipos de dicho virus en la oncogénesis está bien establecido en las Lesiones Genitales, no así en otras localizaciones como la Cavidad oral. Es de aquí que sigue el interés por identificar en lesiones malignas orales cual o cuales de estos tipos son los más frecuentemente implicados¹⁴ . La infección del VPH tiene relación con los hábitos sexuales de los individuos y ha sido demostrado que la frecuencia de esta infección es mayor en personas con múltiples contactos sexuales sin protección, y con el contacto orogenital, anogenital y oroanal; la identificación de VPH en la orofaringe de parejas de pacientes con neoplasia intraepitelial cervical asociada al virus, es mayor que en aquéllas en las que el virus no se identifica; esa presencia podría ser la causa del incremento en el número de pacientes con Cáncer de Lengua-orofaringe que no fuman ni beben alcohol y en menores de 45 años de edad, en contraposición a lo que siempre se ha conocido respecto a que el Cáncer Oral ocurre predominantemente en adultos que utilizan el alcohol y el tabaco en las quinta y sexta décadas de la vida¹⁵ . Las Lesiones pequeñas son a menudo asintomáticas, o pueden presentar síntomas vagos. Sin embargo las lesiones avanzadas que se encuentran a nivel local usualmente se presentan con sintomatología dolorosa, halitosis, y dificultad con el habla, deglución, y masticación.

Según la Organización Mundial de la Salud, los hombres son más afectados que las mujeres debido a la indulgencia más pesada de hábitos en ambos, alcohol y tabaco en la mayoría de los países. Los casos VPH positivos son asociados con

¹⁴ JENG CJ, et al.. Prevalence of cervical human papillomavirus in Taiwanese women. EN: Clin Invest Med. 2005 October. Vol, 28, no.5, p.261-6.

¹⁵ KHAN Z, et al. Detection of survivin and p53 in human oral cancer: correlation with clinicopathologic findings. Head Neck. 2009 August. Vol,31, no.8, p.1039-48

factores de riesgo relacionados al sexo, que también se han relacionado al Cáncer Cervical y un incremento de la actividad orogenital, mientras que el consumo de Tabaco y Alcohol son los principales riesgos para VPH negativo.

En países como Japón, la incidencia del Carcinoma Escamocelular Oral está incrementando gradualmente en las últimas tres décadas, además que las tasas de consumo de tabaco y alcohol han decaído. Éste incremento de la incidencia del Carcinoma Escamocelular Oral puede ser debido al incremento de los casos VPH positivos¹⁶. En otros países las infecciones por el VPH relacionadas con el sexo oral son la primera causa de Cáncer Oral. Los individuos que practican sexo oral tienen ocho veces más posibilidades de desarrollar ésta enfermedad que los menos promiscuos. De ésta manera, la transmisión sexual supera al tabaco como primera causa de estas enfermedades. El Cáncer Oral y Orofaringeo comprende el 3% de todos los canceres en los Estados Unidos¹⁷.

Un aspecto interesante y controvertido es que en pacientes con Carcinoma de Cabeza y Cuello, la asociación de infección de VPH implica mejor pronóstico comparados con pacientes sin esta infección. En enfermos con Cáncer Oral generalmente jóvenes y con infección por VPH se ha encontrado mejor tasa de respuesta a radioterapia y mejor control local, además de incremento en la supervivencia a cinco años comparados con los pacientes no infectados, supervivencia que aún sigue siendo insuficiente a pesar de los esfuerzos científicos y financieros, en mejoras de la detección y diagnóstico precoz los cuales han reducido drásticamente la incidencia de estas neoplasias en los últimos años. Sin embargo, éste hallazgo es debatible y otros autores han atribuido ese

¹⁶ KADEMANI D, et al. Angiogenesis and CD34 expression as a predictor of recurrence in oral squamous cell carcinoma. EN: J Oral Maxillofac Surg. 2009 September. Vol.67, no.9, p. 1800-5.

¹⁷ Op cit. JO S, et al, p.1467-74.

buen pronóstico a mayor radio sensibilidad de la neoplasia pero en asociación con los demás factores pronósticos conocidos, principalmente la presencia o no de metástasis ganglionares cervicales¹⁸.

Los factores de riesgo primario para el desarrollo de cualquiera de los Carcinomas Escamocelulares o de las lesiones potencialmente malignas, no han sido completamente elucidados o aclarados, pero el uso del tabaco o de metabolitos del alcohol son considerados como los principales factores etiológicos¹⁹.

En Sudan, el tabaquismo así como el consumo de alcohol son menos comunes, pero el uso de un tipo de tabaco no fumado, localmente conocido como “toombak” o tabaco sudanés es generalizado. Se ha demostrado que este toombak produce una variedad de cambios patológicos, tales como la Hiperqueratosis y la Displasia, conteniendo altos niveles de nitrosaminas carcinogénicas tabaco específicas que han sido propuestas como el principal factor de riesgo para el Carcinoma Escamo celular. La prevalencia del Cáncer Oral es alta (17% de todos los canceres) y la alta incidencia ha sido fuertemente atribuida al uso del toombak. En estudios realizados en dicho país, acerca de la prevalencia del ADN viral (HPV, HSV-1 Y EBV) utilizando como método la toma de muestras con escobillón (citología) de sujetos que utilizaban en forma crónica el toombak y de sujetos que no lo usaban y muestras de tejidos embebidos en parafina y fijados con formalina de sujetos con Carcinoma Escamocelular y con displasias orales y mediante análisis a través

¹⁸ KOVACIC MB, et al. Epidemiologic analysis of histologic cervical inflammation: relationship to human papillomavirus infections. EN: Hum Pathol. 2008 July. Vol.39, no.7, p. 1088-95

¹⁹ KRUSE AL and GRATZ KW. Oral carcinoma after hematopoietic stem cell transplantation--a new classification based on a literature review over 30 years. EN: Head Neck Oncol. 2009. Vol.1, no.29.

de PCR se observó una alta frecuencia de HPV en sujetos sanos y en pacientes con Cáncer Oral, independientemente del uso de toombak²⁰.

La prevalencia de HPV fue más baja entre los usuarios de toombak que en los que no lo usaban. Estos hallazgos están en acuerdo con algunos reportes pero la influencia de la coexistencia viral en el desarrollo del cáncer oral es clara. También existe evidencia epidemiológica que proporciona o provee apoyo para la asociación entre VPH y un subgrupo de cánceres orofaríngeos²¹.

El VPH forma parte de la familia de los Papillomaviridae. Es epiteliotrópico y puede inducir lesiones hiperplásicas, papilomatosas y verrucosas en el epitelio escamoso estratificado de la piel y mucosas. Es un virus de tamaño pequeño, no encapsulado, con una estructura icosaédrica y una doble cadena de ADN circular 7500 a 8000pb²². El ciclo vital del VPH se inicia con la infección de la capa basal de las células epiteliales, donde el virus expresa las proteínas E1 y E2 asociadas a la replicación y transcripción del ADN viral. Las proteínas E5, E6 y E7 son capaces de inducir la proliferación de las células basales y para-basales, provocando la hiperplasia epitelial. En las capas más superficiales de la epidermis se expresan

²⁰ KULASEKARA KK, et al. Cancer progression is associated with increased expression of basement membrane proteins in three-dimensional in vitro models of human oral cancer. EN: Arch Oral Biol. 2009 October. Vol.54, no.10, p. 924-31.

²¹ 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

²² Ibid, p 120-7

las proteínas L1 y L2 que codifican la cápside y posterior ensamblaje de las partículas virales²³.

La replicación de los VPH depende del grado de diferenciación de los queratinocitos; las partículas virales maduras sólo se detectan en los núcleos de los estratos granuloso y córneo. Los efectos citopáticos que se observan en el epitelio, tales como la presencia de inclusiones intra-citoplasmáticas o nucleares, o la vacuolización peri-nuclear que caracteriza a las células coilocíticas, son secundarios a la interferencia ocasionada por el virus en la diferenciación de la célula huésped. Generalmente el resultado de la infección es la formación de un crecimiento benigno, verruga o papiloma, ubicado en cualquier lugar del cuerpo²⁴.

La Organización Mundial de la Salud ha informado recientemente un incremento importante en el número de pacientes diagnosticados con Cáncer de Cabeza y Cuello originado principalmente en la lengua; si bien el grupo más afectado son los individuos del sexo masculino con edad mayor de 55 años y consumo de alcohol y tabaco, la frecuencia de esta neoplasia en mujeres menores de 45 años que no fuman ni beben alcohol se ha incrementado en forma exponencial. Se estima que ésta neoplasia ocupa el sexto lugar mundial entre todos los tumores²⁵.

²³ LEE YC, et al. Active and involuntary tobacco smoking and upper aerodigestive tract cancer risks in a multicenter case-control study. EN: Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009 December, vol.18, no.12, p.3353-61.

²⁴ LOSI-GUEMBAROVSKI R, et al. Oral carcinoma epidemiology in Parana State, Southern Brazil. EN: Cad Saude Publica. 2009 February, vol.25, no.2, p.393-400.

²⁵ Ibid, p. 393-400

A pesar de su relativa rareza, el Cáncer Oral y Orofaringeo en conjunto, es el cáncer más frecuente del tracto aerodigestivo superior y representan un problema clínico importante debido a que comúnmente se diagnostica en etapas avanzadas, asociándose a un pronóstico grave e importantes secuelas estéticas y funcionales. Según lo mencionan Onizawa K y colaboradores el pronóstico del Carcinoma Escamocelular es pobre, a pesar de los avances en las terapias quirúrgicas y no quirúrgicas, cerca del 50 % mueren dentro de un período de 5 años después de ser diagnosticado. Desafortunadamente el Cáncer Oral, en la mayoría de los casos es detectado tardíamente, cuando ya ha invadido estructuras vecinas, comprometiendo el estado general de salud y ha hecho metástasis a distancia²⁶.

La acumulación de diversos cambios genéticos y asociados con el desarrollo del Cáncer Oral sugieren dos diferentes vías moleculares asociadas con la carcinogénesis, una asociada a la exposición de algunos agentes carcinogénicos presentes en el tabaco y alcohol, sin la participación de la infección por VPH, y la otra exclusivamente con la participación del VPH²⁷. Otras particularidades acompañan al comportamiento epidemiológico de éste cáncer, por ejemplo la tasa de cáncer de vías aéreo-digestivas en afrodescendientes es mayor en países como Estados Unidos, y en Colombia se presenta con mayor frecuencia en la costa pacífica²⁸.

²⁶ LUO CW, ROAN CH, and LIU CJ. Human papillomaviruses in oral squamous cell carcinoma and pre-cancerous lesions detected by PCR-based gene-chip array. EN: Int J Oral Maxillofac Surg. 2007 February, vol.36, no.2, p.153-8.

²⁷ SCHULZ M, et al . [Smokeless tobacco: a new risk factor for oral health? A review]. EN: Schweiz Monatsschr Zahnmed. 2009, vol. 119, no.11, p.1095-109.

²⁸ Ibid, p. 153-8

El Cáncer Oral, Carcinoma Escamocelular Oral o Carcinoma Epidermoide, es una neoplasia maligna derivada del epitelio plano que presenta sus características morfológicas. Suele ser la etapa final de la alteración del epitelio plano estratificado, iniciándose como una displasia epitelial y evolucionando hasta que las células epiteliales displásicas rompen la membrana basal e invaden el tejido conjuntivo. Puede originarse de nuevo a partir del epitelio plano supradyacente y tener una fase premaligna relativamente corta²⁹.

Puede dividirse en tres grandes grupos: Carcinomas propios de la cavidad oral, carcinomas de labio-bermellón y carcinomas de la Orofaringe los cuales son más comunes en hombres que en mujeres, en una relación 2:1³⁰. Sin embargo, hoy en día prevalece la leve disminución de la tasa de cánceres de Cabeza y Cuello en hombres mientras ha aumentado en mujeres, la causa aún se desconoce pero se cree que está asociado a la prevalencia del virus del papiloma humano y la creciente exposición a carcinógenos como el tabaco y el alcohol³¹. Y Lam L y colaboradores reportaron mejor tasa de sobrevida en pacientes femeninos con Cáncer Oral (un 29% menos de riesgo de muerte y un 17% menor riesgo de recidiva)³².

²⁹ Op cit, MAROCCHIO LS, et al. p.267-73

³⁰ SCARDINA GA, PISANO T and MESSINA P. [Oral and cervical lesions associated with human papillomavirus]. EN: Recenti Prog Med. 2009 May, vol.100, vol.5, p.261-6.

³¹ 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.

³² MICHIELS K, et al. Carcinoma cell-derived chemokines and their presence in oral fluid. EN: Eur J Oral Sci. 2009 August, vol.117, no.4, p. 362-8.

La infección por transmisión sexual del VPH es una causa de casi todos los cánceres de cuello de útero. Zur Hausen postuló el papel de los virus del papiloma en el cáncer del cuello del útero en 1976³³. Desde entonces, el VPH se ha establecido como la causa de casi el 100% de los carcinomas de Cuello Uterino³⁴. Sin embargo, la asociación del VPH en lesiones orales precancerosas y cancerosas no ha sido tan consistente como en el cáncer cervical. Aunque los factores de riesgo en la patogénesis del Cáncer Oral incluyen los agentes infecciosos, el posible papel etiológico de las lesiones orales precancerosas y el cáncer también ha sido sugerido por el descubrimiento del VPH³⁵. Existe evidencia molecular que proporciona apoyo del papel del VPH, particularmente del VPH16n en la patogénesis de un subconjunto de Carcinomas Escamocelulares de Cabeza y Cuello³⁶.

Según Cotran RS, Kumar V. y cols, el Cáncer Oral es una neoplasia maligna de comportamiento agresivo, que comprende el 4 al 5 % de todos los tumores que afectan al ser humano y es un problema grave de salud a nivel mundial, debido al aumento de su incidencia en los últimos años y su alta tasa de mortalidad. La mayoría de los Cánceres Orales, son del tipo Carcinoma Escamocelular, lo que

³³ ZUR HAUSEN H. Papillomavirus and p53. Nature. 1998 May 21, vol. 393, no.6682, p. 217.

³⁴ MENDENHALL WM and LOGAN HL. Human Papillomavirus and Head and Neck Cancer. EN: Am J Clin Oncol. 2009 Jul 31.

³⁵ SAGHRAVANI N, et al. Low prevalence of high risk genotypes of human papilloma virus in normal oral mucosa, oral leukoplakia and verrucous carcinoma. EN: Acta Odontol Scand. November, vol.69, no.6, p. 406-9.

³⁶ Op cit., MICHELS K, et al. p. 362-8.

presenta el 91 % de todos ellos. De Stefani B P y colaboradores, reportan una incidencia de 93,8 % de todos los canceres orales³⁷.

El VPH, a diferencia de otros virus, no crece en cultivos celulares, de una manera que permita la realización de ensayos antivirales adecuados. Por otro lado, en contraste a los herpes virus, que codifican 72 proteínas virales, el VPH codifica sólo 9 a 10 tipos de proteínas, carece de proteasas, ADN polimerasa, o de enzimas involucradas en el metabolismo de los nucleótidos. Todo esto ha impedido el desarrollo de terapias específicas contra el VPH³⁸.

VPH es un virus pequeño de ADN con cerca de 7 900 bases de nucleótidos de largo. Hay más de 120 genéticamente diferentes, pero estrechamente relacionado con los VPH que se denominan genotipos. Los genotipos están numerados en el orden de su descubrimiento. De ésta manera han sido identificados más de 130 tipos, aunque sólo unos 80 han sido completamente caracterizados³⁹. El VPH tiene un amplio espectro de enfermedades que afectan a las áreas cutáneas y mucosas del cuerpo, que van desde verrugas benignas comunes a un carcinoma invasor. Éstas áreas incluyen el tracto anogenital, uretra, piel, laringe, mucosa traqueobronquial, cavidad nasal, senos paranasales, y Cavidad oral⁴⁰. Existen

³⁷ Op cit. KUMARASWAMY KL and VIDHYA M. p. 120-7

³⁸ MOSLEH-SHIRAZI MS, MOHAMMADIANPANA M and MOSLEH-SHIRAZI MA. Squamous cell carcinoma of the oral tongue: a 25-year, single institution experience. EN: J Laryngol Otol. 2009 January, vol.123, no.1, p.114-20.

³⁹ NAIR S and PILLAI MR. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. Oral Dis. 2005 November, vol.11, no.6, p. 350-9.

⁴⁰ NAKAMORI K, et al. Carcinoma ex pleomorphic adenoma of the buccal region is composed of salivary duct carcinoma and squamous cell carcinoma components. EN: Int J Oral Maxillofac Surg. 2009 October, vol. 38, no.10, p. 1116-8.

más de 100 diferentes tipos de VPH y difieren en cuanto a los tipos de epitelio que infectan. Más de cuarenta tipos infectan superficies mucosas incluyendo el epitelio ano genital. Se desconoce la razón por qué ciertos tipos de VPH de la piel tienen como destino la piel de las manos o los pies, mientras que otros infectan la mucosa oral y a los genitales de hombres y mujeres. Varios tipos tienen especificidad para ciertos tipos de células humanas y causar distintos tipos de lesiones⁴¹. Para la mayoría de estos tipos de VPH existen desde hace mucho tiempo evidencias moleculares y epidemiológicas del efecto carcinogénico o no carcinogénico para clasificarlos en grupos de alto riesgo o bajo riesgo⁴².

El VPH generalmente se transmite mediante el contacto directo de piel con piel y con más frecuencia durante el contacto genital con penetración (relaciones sexuales vaginales o anales). Otros tipos de contacto genital en ausencia de penetración (contacto oral-genital, manual-genital y genital-genital) pueden causar una infección por el VPH, pero esas vías de transmisión son mucho menos comunes que la relación sexual con penetración⁴³. Las infecciones genitales por el VPH son poco comunes en las mujeres que reportan no haber tenido relaciones sexuales anteriormente y se presentan en menos de un 2% de esta población. De esta forma el comportamiento sexual es el factor de predicción más constante en la adquisición de una infección. De otra parte la revisión actual afirma que el modo de transmisión oral de VPH no está claro. El VPH puede establecer una infección

⁴¹ Op cit. KUMARASWAMY KL and VIDHYA M. p. 120-7

⁴² NDIAYE IC, et al. Squamous carcinoma of the hypopharynx in children in Senegal: between disarray and enigma. EN: Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2009 March, vol.73, no.3, p. 357-61

⁴³ NEUFCEUR PE, et al. [Involvement of human papillomavirus in upper aero-digestive tracts cancers]. Bull Cancer. 2009 October, vol.96, no.10, p.941-50.

latente subclínica, que pueden haber sido adquirida a temprana edad, es decir, su origen desde el nacimiento por la infección del cuello uterino de la madre (perinatal), pero la mayoría de la transmisión es horizontal⁴⁴(32). La infección oral por VPH se puede asociar con distintas enfermedades de la cavidad Oral. La infección oral por VPH puede ser considerada como molestia más que una enfermedad grave, excepto en algunas circunstancias, cuando el virus se piensa como la causa del Carcinoma Oral de Células Escamosas. Las Lesiones Orales por VPH pueden dar lugar a manifestaciones clínicas diversas, que van desde la benigna, hiperplasia papilomatosa, o lesiones verrugosas hasta los cambios carcinomatosos⁴⁵.

Desde 1995 la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) reporto el efecto carcinogénico de los VPH tipo 16 y 18 en humanos. Los condilomas acuminados o verrugas genitales son lesiones benignas producidas por el VPH de los tipos 6 y 11, en tanto los VPH oncogénicos 16 y 18, generalmente se asocian, a lesiones subclínicas, neoplasias intra-epiteliales, algunos canceres orofaríngeos y cáncer ano genital⁴⁶. Las proteínas virales E6 y E7 participan en el proceso de oncogénesis. La proteína E6 de los tipos 16 y 18 de VPH tiene la capacidad de interactuar con proteínas celulares de la regulación del ciclo celular⁴⁷. Dentro de

⁴⁴ PINHEIRO RDOS S, et al. Human papillomavirus in the oral cavity of children. EN: J Oral Pathol Med. February, vol.40, no.2, p.121-6.

⁴⁵Op cit. KUMARASWAMY KL and VIDHYA M. p. 120-7

⁴⁶ Op cit. BOSCH FX, DE SANJOSE S. p. 213-27

⁴⁷ NIELSEN A, et al. Type-specific HPV infection and multiple HPV types: prevalence and risk factor profile in nearly 12,000 younger and older Danish women. EN: Sex Transm Dis. 2008 March, vol.35, no.3, p. 276-82.

las proteínas que son degradadas, destaca la proteína p53, cuya misión es proteger la integridad del genoma durante el ciclo celular, impidiendo que se propaguen mutaciones a las células hijas que pueden evolucionar hacia una neoplasia. La proteína E7 coopera con la E6 en la inmortalización de los queratinocitos, interactuando con proteínas reguladoras del crecimiento celular como p107 y p130, relacionadas con el gen pRB, ciclina A y los factores de transcripción de la familia AP1⁴⁸.

La organización genética de todos los VPH es similar, formada por tres grandes regiones, una región temprana en la que se encuentran los genes responsables de la transcripción, replicación y transformación, conocidos como genes E (E1, E2, E4, E5, E6, E7 y E8), una región tardía, que codifica dos proteínas de la cápside, L1 mayor y L2 menor, y finalmente una región larga de control, que contiene elementos de regulación para la transcripción y replicación viral⁴⁹.

Las infecciones con Virus de inmunodeficiencia Humana aumentan el riesgo de persistencia de infecciones y enfermedades relacionadas con el HPV, incluyendo verrugas genitales, cáncer cervical y cáncer anal. Hombres que tuvieron sexo con hombres tienen marcadamente altas tasas de enfermedades relacionadas con VPH, incluyendo el cáncer anal, principalmente atribuible a la alta prevalencia de infección por HPV y por VIH⁵⁰. El advenimiento de las terapias antiretrovirales

⁴⁸ NOVAKOVA V and LACO J. [Role of human papillomavirus in carcinogenesis of head and neck cancer]. *Klin Onkol.* 2008, vol. 21, no.4, p. 141-8

⁴⁹ OLIVEIRA MC, et al. High-risk human papillomavirus (HPV) is not associated with p53 and bcl-2 expression in oral squamous cell carcinomas. *EN: Auris Nasus Larynx.* 2009 August, vol.36, no.4, p. 450-6

⁵⁰ PALEFSKY J. Biology of HPV in HIV infection. *EN: Adv Dent Res.* 2006, vol.19, no.1, p. 99-105.

reduce la alta incidencia por VPH relacionadas con el cáncer en individuos infectados con VIH. Las infecciones relacionadas al HPV son una apremiante preocupación de salud para los homosexuales, especialmente para los que están infectados con VIH⁵¹; pero en estudios realizados por Gilbert, Paul A. encontraron pocas diferencias relativas al HPV relacionadas con actitudes y creencias por el estado de VIH positivo⁵². Muchos hombres creen correctamente que el VIH incrementa el riesgo de enfermedades relacionadas con VPH, pero muchos de ellos no, en general se percibió que el conocimiento sobre las enfermedades relacionadas con VPH fue bajo⁵³.

El Carcinoma Escamocelular Oral considerado como uno de los principales problemas alrededor del mundo, es la neoplasia más frecuentemente diagnosticada en la mucosa del área cervicofacial, originada por el estímulo nociceptivo causado por el consumo crónico de tabaco, alcohol, cannabis y factores locales irritantes como la placa dentobacteriana⁵⁴. Squier y colaboradores demostraron respecto al alcohol que tiene la capacidad de eliminar el componente lipídico de la barrera presente en la cavidad oral que rodea los gránulos de la capa

⁵¹ 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.

⁵² SAHEBJAMEE M, et al. Human papillomavirus in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma. EN: Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2009 October, vol.14, no.10, p. 525-8.

⁵³ PALEFSKY J. Human papillomavirus-related disease in people with HIV. EN: Curr Opin HIV AIDS. 2009 January, vol.4, no.1, p. 52-6.

⁵⁴ ORTHOLAN C, et al. Oral cavity squamous cell carcinoma in 260 patients aged 80years or more. EN: Radiother Oncol. 2009 December, vol.93, no.3, p. 516-23.

espinosa del epitelio⁵⁵ , y su exposición a corto plazo aumentó la permeabilidad de la mucosa ventral de la lengua en humanos. Aunque la mayor parte del metabolismo del alcohol se lleva a en el hígado, hay buena evidencia para mostrar un metabolismo extrahepático del alcohol en acetaldehído, y en particular se ha demostrado que éste se produce en la cavidad oral⁵⁶. La evidencia experimental ha demostrado que en la microflora oral se producen cantidades considerables de acetaldehído durante el consumo social de alcohol y esto ocurrió en mayor medida en las personas con tendencia a la flora aeróbica. Recientemente, las investigaciones demuestran el nivel de actividad de alcohol deshidrogenasa en una amplia gama de bacterias orales⁵⁷. Estos autores concluyen que los estreptococos orales puede contribuir significativamente a la normal variación individual de los niveles de acetaldehído salival después el consumo de alcohol y así también el riesgo de Cáncer Oral⁵⁸ . Éste hecho puede ser el mecanismo que explica los fenómenos observados de que los individuos con mala higiene oral tienen un mayor riesgo de desarrollar Cáncer Oral⁵⁹ .

⁵⁵ SARKOLA M, et al. Human papillomavirus DNA detected in breast milk. EN: *Pediatr Infect Dis J*. 2008 June, vol.27, no.6, p. 557-8

⁵⁶ PANIZZA B. Prognostic factors and the treatment of the negative neck in oral carcinoma. EN: *ANZ J Surg*. 2009 Jan-Feb, vol.79, no.1-2, p. 7-8.

⁵⁷ RANKIN KV, et al. Oral health in cancer therapy. EN: *Tex Dent J*. 2009 May, vol.126, no.5, p. 389-97, 406-19, 22-37.

⁵⁸ RAZAK AA, et al. Oral cancer presentation among Malay patients in hospital Universiti Sains Malaysia, Kelantan. EN: *Asian Pac J Cancer Prev*. 2009, vol.10, no.6, p. 1131-6.

⁵⁹ PARKINS GE, ARMAH GA and TETTEY Y. Orofacial tumours and tumour-like lesions in Ghana: a 6-year prospective study. EN: *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2009 October, vol.47, no7, p. 550-4.

Las tasas de incidencia de esta enfermedad son altas en países en desarrollo, sin embargo la incidencia del Carcinoma Escamo Celular también está aumentando en países desarrollados como por ejemplo el sur y el este de Europa, Escandinavia ⁶⁰. La infección por VPH ha sido asociada como factor de riesgo para padecer esta neoplasia, su ADN genómico oncogénico es detectado en aproximadamente 26% de todos los Carcinomas Escamocelulares de Cabeza y Cuello a nivel mundial, pero la evidencia molecular es más rigurosa y consistente para Carcinoma Orofaringeo Escamocelular, en el cual la integración viral y la expresión de los oncogenes(E6 y E7) ha sido mostrada⁶¹. También se describen la relación de la infección por VPH genital y anogenital con la infección viral de las mucosas del área de Cabeza y Cuello, dado que es una infección sexualmente transmisible; existe evidencia clínica que ha demostrado que el número de parejas sexuales y el contacto orogenital son, en forma significativa, factores de riesgo para contraer la infección⁶².

El diagnóstico de VPH es basado en herramientas moleculares. Estos métodos pueden envolver directamente la hibridación con sondas DNA complementarias tales como el southern blotting o hibridación in situ, amplificación de la señal tales como la captura híbrida o la amplificación del ácido nucleico por la reacción de cadena polimerasa. Esta PCR se considera el más sensible método para

⁶⁰ SCULLY C and BAGAN JV. Recent advances in oral oncology 2008; squamous cell carcinoma imaging, treatment, prognostication and treatment outcomes. EN: Oral Oncol. 2009 June, vol.45, no.6, p. 25-30.

⁶¹ 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.

⁶² PEREZ-SAYANS M, et al. Genetic and molecular alterations associated with oral squamous cell cancer (Review). EN: Oncol Rep. 2009 December, vol.22, no.6, p. 1277-82.

detección de DNA en HPV en muestras clínicas⁶³. Esta técnica es utilizada para la amplificación de regiones específicas de ADN por múltiples ciclos de polimerización del ADN, seguido cada uno por un breve tratamiento de calor para separar las cadenas complementarias⁶⁴. En la actualidad la PCR de anidación estándar puede ser ejecutada utilizando cebadores degenerativos seguidos por una secuencia por contacto directo del producto de la PCR. Alternativamente el producto de la PCR pueden ser hibridados al DNA de los tipos de VPH conocidos, para determinar el tipo de VPH presente en la muestra de PCR amplificada. Para ambos ensayos se requiere mucho tiempo y no permiten la cuantificación del ADN viral para hacer frente al papel de la carga viral en la progresión de la enfermedad. La PCR cuantitativa en tiempo real permite la cuantificación sobre 8 órdenes de magnitud⁶⁵. Mientras que ensayos de PCR cuantitativa han sido desarrollados para HPV 16 Y/o 18⁶⁶.

El diagnóstico del VPH en cavidad oral puede sospecharse mediante inspección de la lesión y también a través de Citología y Biopsia, pero su detección es basada en herramientas moleculares las cuales varían ampliamente en cuanto a la

⁶³ RIVERO ER AND NUNES FD. HPV in oral squamous cell carcinomas of a Brazilian population: amplification by PCR. EN: Braz Oral Res. 2006 Jan-Mar, vol.20, no.1, p.21-4.

⁶⁴ PIAO Y, et al.. Evaluation of 18F FDG PET/CT for diagnosing cervical nodal metastases in patients with oral cavity or oropharynx carcinoma. EN: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009 December, vol.108, no.6, p. 933-8.

⁶⁵ Op cit., MICHELS K, et al. p. 362-8.

⁶⁶ PITIYAGE G, et al. Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. J Oral Pathol Med. 2009 November, vol.38, no.10, p. 737-52.

sensibilidad y especificidad concierne⁶⁷ . La PCR es usada en el diagnóstico y estudio de enfermedades infecciosas y tumores malignos asociado con microorganismos, proporcionando así mismo un claro entendimiento en la patogenia de la neoplasia. Puede utilizarse para detectar la mutación en los oncogenes asociados con el cáncer, genes supresores del tumor (ej. p53, p16). La PCR ha incrementado el rango y la sensibilidad de procedimientos diagnósticos, pero aún con un gran inconveniente como lo es la contaminación, puede dar lugar a dificultades en la interpretación de los resultados deseados⁶⁸ . Estas herramientas moleculares se dividen en tres: las de baja sensibilidad como lo son la Inmunohistoquímica e hibridación in situ, las cuales solo detectan el virus cuando está presente en más de 10 copias de ADN viral por célula. Las de sensibilidad moderada como el southern blot, que detectan el virus en 1 a 10 copias del ADN viral por célula. Y las de alta sensibilidad como la Reacción en Cadena Polimerasa (PCR), que detectan el virus en menos de una copia de ADN viral por célula. La idea básica de esta técnica es sintetizar muchas veces un fragmento de ADN utilizando un polimerasa que puede trabajar a temperaturas elevadas, se simula lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN, utilizando los ingredientes necesarios la polimerasa, el ADN del organismo que se necesita estudiar, los oligonucleótidos (primers, iniciadores, cebadores) necesarios para que se inicie la transcripción, dinucleotidos, y las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente⁶⁹ . (Dentro de los tipos de PCR encontramos: PCR anidada, PCR de extensión solapada, PCR in situ, PCR múltiple, PCR con transcriptasa inversa (RT PCR), PCR en tiempo real o PCR cuantitativo y variaciones de la PCR básica:

⁶⁷ GALVÃO CASTRO THEREZITA AND IVO BUSSOLOTI FILHO. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. EN: Rev Bras Otorrinolaringol. 2006; vol.72, no.2, p.272-82

⁶⁸ KMK MASTHAN, et al. Advanced Diagnostic Aids in Oral Cancer. EN: Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2012, Vol 13

⁶⁹ Op cit, GALVÃO CASTRO THEREZITA AND IVO BUSSOLOTI FILHO, p.272-82

PCR anidada: técnica muy sensible de PCR en la que el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada.

PCR in situ: consiste en una reacción de PCR en secciones histológicas o células, donde los productos generados pueden visualizarse en el sitio de amplificación. Es realizada sobre preparaciones fijas en portaobjetos. Amplifica específicamente una población de secuencias de menor representación.

PCR multiplex: PCR donde se amplifica más de una secuencia en una misma reacción, utilizando 2 o más pares de cebadores en un único tubo con el fin de amplificar simultáneamente múltiples segmentos de ADN.

PCR con transcriptasa inversa: es una variante de la PCR en la que usamos como molde inicial ARN en vez de ADN, y emplea una transcriptasa inversa (como Tth) para realizar la síntesis de un ADN complementario al ARN.

PCR en tiempo real o cuantitativa: reacción de PCR cuya principal característica es que permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN presentes en la muestra original, o para identificar con una muy alta probabilidad muestras de ADN específicas a partir de su temperatura de fusión (valor T_m : melting temperature)

⁷⁰.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 TIPO DE ESTUDIO

El tipo de estudio Descriptivo de Corte transversal Retrospectivo, el cual se constituyó en una herramienta para exploración de la presencia de Virus

⁷⁰ http://www.medicinenet.com/pcr_polymerase_chain_reaction/article.htm

Papiloma Humano en bloques de parafina de pacientes diagnosticados con Carcinoma Escamocelular de un Hospital de la ciudad de Cartagena .

5.2 POBLACION Y MUESTRA

La población que se estudio estuvo conformada por bloques de parafina de pacientes con diagnóstico de Carcinoma Escamocelular , describiendo sus características histopatológicas, incluyendo el estatus de diferenciación (bueno, moderado o pobre) y sus variantes histopatológicas, en el periodo comprendido del año 2007 al 2011 en el Laboratorio de Patología de un Hospital de la ciudad de Cartagena.

5.2.1 Criterios de Inclusión

Bloques de parafina, pertenecientes a Pacientes de ambos sexos, sin rangos de edad específico, diagnosticados Histopatológicamente con Carcinoma Escamocelular Oral en el Laboratorio de Patología de un Hospital de la ciudad de Cartagena entre los años 2007 y 2011.

5.2.2 Criterios de Exclusión

Muestras de Pacientes con diagnostico histopatológico de neoplasias Malignas diferentes al Carcinoma Escamocelular Oral.

Bloques de parafina cuyo procesamiento resulte insuficiente para extracción de ADN y posterior procesamiento molecular.

5.3 VARIABLES Y OPERACIONALIZACION

VARIABLES	Dimensión		Tipo de variable	Escala de la variables
1. Características sociodemográficas	Sexo	M-F	Cualitativa	Nominal
	Edad	Años cumplidos	Cuantitativa	Razón
	Procedencia	Rural-Urbana	Cualitativa	Nominal
	Habitos	Alcohol Si-No Cigarrillo Si-No	Cualitativa	Nominal
2. Tipos de VPH	Tipo 16	Si-No	Cualitativa	Nominal
	Tipo 18	Si-no		
	Otro	Cual		
3. Presencia del VPH	SI NO OTRO	SI NO CUAL	Cualitativa	Nominal

5.4 PROCEDIMIENTO DE RECOLECCION DE DATOS

La metodología usada en este proyecto comprendió 7 fases:

Etapa 1. Recolección de muestras

Etapa 2. Desparafinación de bloques de parafina

Etapa 3. Extracción de DNA

Etapa 4. Evaluación de la calidad del DNA

Etapa 5. Detección del Virus de Papiloma Humano (VPH) mediante Reacción en cadena de la polimerasa.

Etapa 6. Visualización de productos génicos

Etapa 7. Análisis de datos

Etapa 1. Recolección de muestras

Inicialmente se realizó una revisión de reportes de Carcinoma Escamocelular en diferentes sitios de la cavidad oral y orofaringe, así como de diferentes variantes (origen) histopatológicas, pertenecientes a los archivos del laboratorio de patología de un Hospital de la ciudad de Cartagena. Los casos fueron identificados desde los archivos retrospectivos de patología de donde se seleccionaron 67 bloques de tejido parafinado bajo los parámetros anteriores desde el año 2007 hasta 2011. De éstos fueron seleccionados 15 casos del año 2009, que correspondían al diagnóstico de Carcinoma Escamocelular Epidermoide de bajo, moderado y de grado bien diferenciado, localizados en Cavidad Oral.

Los bloques de parafina seleccionados fueron solicitados al director del laboratorio de patología, previa autorización de la subgerencia científica de investigaciones y la subgerencia científica de apoyo diagnóstico y terapéutica de un hospital de la ciudad de Cartagena.

Las muestras fueron solicitadas al citotéclogo, teniendo en cuenta las siguientes recomendaciones: realizar para cada muestra 10 cortes de 5 μm y colocarlos en tubos eppendorf estériles, rotulados con el N^o de caso.

Del reporte de patología de cada caso seleccionado fue extraída la siguiente información: sitio anatómico del tumor de origen determinado por el medico u odontólogo tratante y confirmado por el patólogo, la edad del sujeto y el género. Los datos demográficos de fumador y/o alcohol no estuvieron disponibles para

ninguno de los casos referidos al servicio de biopsias. Los bloques de parafina fueron rotulados con un número diferente al reporte de patología del paciente.

Inicialmente la realización de éste estudio se ejecutaría con las muestras patologías de Carcinoma Escamocelular oral encontradas dentro de los 5 años anteriores al año 2011, pero los bloques de parafina del 2007 y 2008 ya no se encontraban disponibles en el laboratorio. Por motivos estrictamente financieros se trabajó con el año 2009, iniciando de esta forma el estudio consecutivo de las muestras.

Etapa 2. Desparafinación de bloques de parafina

El protocolo de desparafinación fue realizado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante del sistema comercial utilizado para la extracción de DNA en muestras de tejido parafinado: Kit QIAamp® DNA FFPE (Quiagen).

Teniendo los cortes de tejido en el tubo eppendorf, se adicionaron 1000 µL de Xilol, agitando vigorosamente por 15 segundos. Luego se lleva a centrifugación a 12.000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente (15-25 °C). Se removió el sobrenadante por inversión con la precaución de no remover el pellet, posteriormente se adicionaron 1000 µL de etanol absoluto 100%, al pellet para remover residuos de xilol y se mezcla suavemente por vortex. Nuevamente se centrifugaron los tubos a 12.000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Cuidadosamente se descartó el etanol con micropipeta y se procede a repetir una vez más el lavado con etanol absoluto para terminar de remover trazas de xilol que pudieron haber quedado tras la primera lavada, se centrifuga y se descarta el etanol.

Finalmente, se realizó una incubación a 37°C por un tiempo de 10 minutos dejando los tubos eppendorf abiertos para que se evapora el etanol.

Etapa 3. Extracción de DNA

En cada tubo se adicionaron 180 µL de buffer ATL (buffer de lisis tisular), posteriormente se procede a macerar el tejido por acción mecánica con pistilo estéril, luego se añaden 20 µL de proteinasa K (20 mg/ml) los cuales se mezclan por vortex para homogenizar la muestra, y se incubaron a 56 °C por 24 horas en baño de agua para lisar completamente el tejido. Pasado este tiempo, se inactivó la proteinasa K por calentamiento 10 min a 70 °C y se adicionaron 200 µL de buffer AL a la muestra, se mezclan por vortex por 15 segundos y luego se añaden 200 µL de etanol absoluto 100%, se mezclaron nuevamente por vortex 15 segundos y se centrifugó a 14.000 rpm por 1 min. La mezcla del paso anterior se transfirió a la columna ***Qiaamp DNA mini kit*** y se centrifuga a 8.000 rpm por 1 min. La columna se remueve y se coloca en otro tubo recolector. Se adicionaron 500 µl de buffer AW1 (buffer de lavado 1) a la columna y se centrifugaron por 1 min a 8.000 rpm, una vez más la columna se transfirió a un tubo nuevo. El procedimiento del lavado se repite con 500 µL buffer AW2 (buffer de lavado 2), seguido de centrifugación por 3 minutos a 13.000 rpm para secar la membrana de la columna de residuos de etanol. Se adicionaron 20 µL de buffer AE, por 5 min y luego se centrifuga por 1 min a 8.000 rpm. En un tubo nuevo, el ADN extraído de la columna, se distribuye en alícuotas y las muestras se almacenan a -20 °C.

La concentración y pureza del DNA fue evaluada por espectrofotometría de luz ultravioleta a 260 y 280 nm en un NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific) (Pin *et al.*, 2013).

La pureza fue calculada empleando el cociente Absorbancia 260/Absorbancia a 280. El cociente aproximadamente de 1,8 y 2,0, indicaron la presencia de ADN

puro. La absorción a 230 nm significa que la muestra está contaminada con hidratos de carbono, péptidos, fenoles, compuestos aromáticos u otras sustancias. El cociente Absorbancia 260/Absorbancia 230 de las muestras indicó pureza cuando fue de 2,2 aproximadamente.

Etapas 4. Evaluación de la calidad del DNA

La integridad del ADN obtenido y la ausencia de inhibidores de PCR fue evaluada empleando la amplificación del gen β -Globina, siendo el indicador un fragmento de 170 pb del gen house keeping β -globina. Solo las muestras con bandas visibles en el gel fueron incluidas en este estudio. Las secuencias de los cebadores usados en esta reacción fueron:

PCO3:(5'-3') ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC

PCO4:(5'-3') CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC

Las condiciones para la amplificación incluyeron un paso de desnaturalización a 94°C por 4 min, 35 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 30 seg, anillaje a 60°C por 1 min, y extensión a 72 °C por 1 min. Finalmente un paso de extensión a 72 °C por 5 min.

Para confirmar los resultados obtenidos, se realizó la amplificación del gen B globina por PCR en tiempo real utilizando SybrGreen en el equipo Biorad teniendo los mismos pasos de amplificación que la PCR convencional y confirmando el producto específico con curvas melting.

Etapas 5. Detección del Virus de Papiloma Humano (VPH) mediante Reacción en cadena de la polimerasa

La detección del VPH genérico fue realizada mediante una PCR convencional utilizando las secuencias de los siguientes cebadores:

GP5+ (5´-3´) TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC

GP6+(5´-3´) GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C

Las condiciones para la amplificación incluyeron un paso de denaturalización a 94°C por 4 min., 35 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 1 min., anillaje a 40°C por 2 min., y extensión a 72°C por 1 min 30 seg. Finalmente un paso de extensión a 72°C por 4 min.

Tipificación del Virus de Papiloma Humano (VPH)

HPV16: Las secuencias de los cebadores utilizados en esta reacción fueron:

16 (a)(5´-3´) GAC CCA GAA AGT AGT TAC CAC AG

16 (b)(5´-3´) CAC AAC GGT TTG TTG TAT TG

Las condiciones para la amplificación incluyeron un paso de desnaturalización a 94°C por 4 min., 35 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 30 seg., anillaje a 48°C por 30 seg., y extensión a 72°C por 30 seg. Finalmente un paso de extensión a 72°C por 5 min.

HPV18: Las secuencias de los cebadores utilizados en esta reacción fueron:

18 (a)(5´-3´) GGC TTC ACA CTT ACA ACA CA

18 (b)(5´-3´) AAG AAA ACG ATG AAA TAG ATG GA

Las condiciones para la amplificación incluirán un paso de desnaturalización a 94°C por 4 min., 35 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 30 seg., anillaje a

53°C por 30 seg., y extensión a 72°C por 30 seg. Finalmente un paso de extensión a 72°C por 7 min.

Todas las reacciones de amplificación por PCR incluyeron controles positivos de la línea celular Hela, la cual es positiva para la amplificación de HPV.

Etapas 6. Visualización de productos génicos

Todos los productos: DNA y amplicones obtenidos fueron visualizados utilizando electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

6. RESULTADOS

De los 67 bloques de parafina de Carcinoma Oral y Orofaringeo se seleccionaron (15) casos desde 2007 al 2011 que correspondían al diagnóstico de Carcinoma Escamocelular Epidermoide de bajo, moderado y de grado bien diferenciado, localizados exclusivamente en cavidad oral. Ver Tabla 1.

Tabla 1. Número de casos según el año

AÑO	Carcinoma Escamocelular Oral y Orofaringeo	Carcinoma Oral	Carcinoma Oral Epidermoide
2007	5	3	2
2008	14	9	5
2009	26	21	15
2010	13	9	9
2011	14	6	6
TOTAL	72	48	37

Características Clínicas, Patológicas y Demográficas de las muestras de los pacientes.

En la Etapa de Recolección del 2009 se reportaron un total de 15 muestras con informe de patología de Carcinoma Escamocelular Oral, fueron evaluadas para la detección del VPH. Ver tabla 2

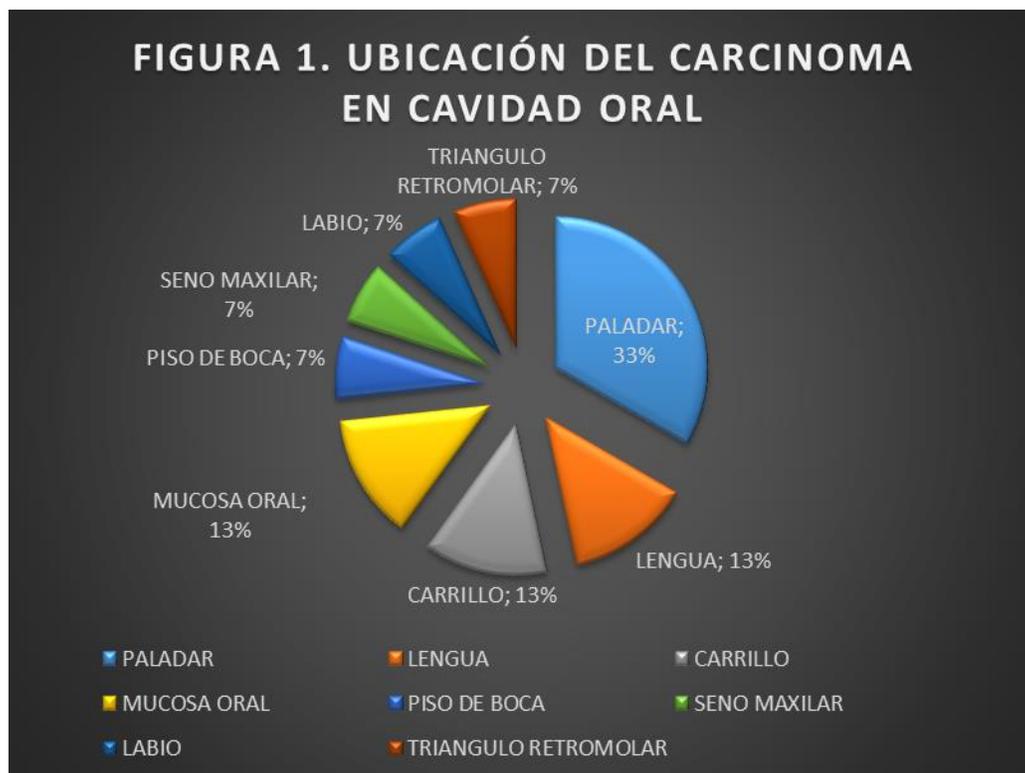
Tabla 2. Características clínicas y patológicas de las muestras evaluadas

Código de MUESTRA	SITIO ANATÓMICO	VARIANTE HISTOPATOLÓGICA DEL CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL	GRADO DE DIFERENCIACIÓN EL TUMOR	INFILTRANTE / IN SITU
712	Lengua	Convencional	Bien	Infiltrado
748	Paladar	Convencional	Pobre	Infiltrado
942	Carrillo derecho	Convencional	Moderado	Infiltrado
1211	Triangulo retromolar izquierdo	Convencional	Moderado	Infiltrado
1553	Mucosa oral	Convencional	Moderado	Infiltrado
1563	Mucosa oral	Convencional	Bien	Infiltrado
1564	Carrillo izquierdo	Convencional	Bien	Infiltrado
2235	Seno maxilar	Convencional	Moderado	Infiltrado
2438	Paladar	Convencional	Bien	Infiltrado
2783	Paladar	Convencional	Bien	Infiltrado
2877	Piso de boca	Convencional	Bien	Infiltrado
3320	Paladar	Convencional	Bien	Infiltrado
3337	Paladar	Convencional	Bien	Infiltrado

Las características demográficas de la población de estudio reportan 6 personas del sexo femenino y 9 del sexo masculino, en cuanto a las edades oscilaron entre 40 a 90 años, la población esta clasificada entre adulto y adulto mayor, así: 5 muestras de los pacientes estaban entre las edades entre 60 y 70 años, 3

muestras entre los rangos 50 y 60 años, 70 – 80 y 80 - 90 años respectivamente. Un paciente estuvo en el rango de los 40 y 50 años.

En cuanto al sitio de localización del Carcinoma Escamocelular se encontró mayor numero en el paladar 5 y la de menor con 1 caso en labio, seno maxilar , piso de boca y triangulo retro molar, ver (Figura 1)



En cuanto al nivel de diferenciación 10 biopsias reportaron un diagnóstico con un grado bien diferenciado del Carcinoma Escamocelular. 4 de las muestras reportaron un grado de diferenciación moderado y una muestra lo hizo en un grado pobremente diferenciado.

PREVALENCIA DE VPH.

Para determinar el número de muestras de pacientes con VPH del total de muestras del 2009, se realizó un análisis molecular que permitió identificar la

presencia del virus, debido a que las muestras no tenían la identificación de presencia del VPH

En la Etapa Desparafinación de bloques de parafina , se observó que algunas muestras como las enumeradas con 1211-2438-2877-3337 poseían gran cantidad de tejido para evaluar, mientras que en otras muestras había poco , y en ellos la eliminación de parafina fue realizada exclusivamente por la Patóloga Oral. Rotulación de los tubos eppendorf y colocación del tejido con el mínimo de parafina. **En la de Extracción de DNA** se utilizo el Kit QIAamp® DNA FFPE (Quiagen).de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En la tabla 3, aparecen descritos los resultados correspondientes a la concentración y pureza evaluado por espectrofotometria UV. La figura 1 muestra un ejemplo de las curvas obtenidas para la lectura de concentración del DNA.

Tabla 3. Concentración y pureza de muestras de DNA obtenidas

#	Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
37	2438	36,2	ng/µl	0,724	0,401	1,80	0,77	DNA	50,00
38	2783	35,1	ng/µl	0,702	0,388	1,81	1,15	DNA	50,00
39	3337	134,3	ng/µl	2,687	1,371	1,96	1,69	DNA	50,00
40	1211	109,9	ng/µl	2,198	1,206	1,82	1,80	DNA	50,00
41	2235	81,3	ng/µl	1,625	0,867	1,87	0,94	DNA	50,00
42	2235	29,2	ng/µl	0,584	0,312	1,87	1,46	DNA	50,00
43	99A	73,1	ng/µl	1,462	0,801	1,82	0,94	DNA	50,00
44	942	217,9	ng/µl	4,358	2,213	1,97	1,74	DNA	50,00
45	748	15,6	ng/µl	0,312	0,177	1,76	0,83	DNA	50,00
46	712	22,5	ng/µl	0,451	0,220	2,05	0,52	DNA	50,00
47	1563	58,4	ng/µl	1,169	0,622	1,88	0,60	DNA	50,00
48	2877	57,4	ng/µl	1,148	0,638	1,80	0,79	DNA	50,00
49	3320	50,7	ng/µl	1,015	0,499	2,04	1,19	DNA	50,00
50	1563	77,6	ng/µl	1,552	0,860	1,80	1,45	DNA	50,00
51	313	33,8	ng/µl	0,676	0,373	1,81	0,39	DNA	50,00
52	313	36,3	ng/µl	0,726	0,383	1,90	0,41	DNA	50,00

En cuanto a la calidad del DNA

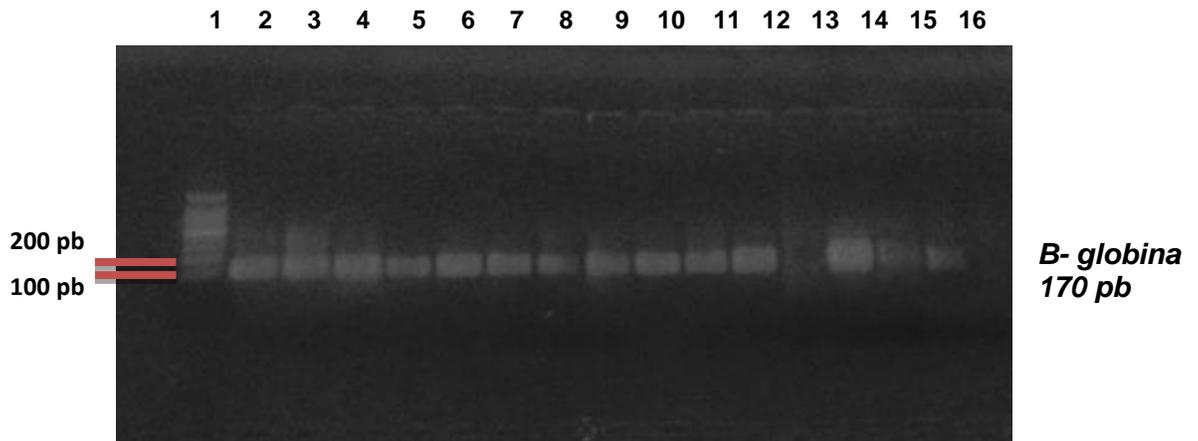


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % productos amplificados de PCR con los primers **PCO3/PCO4** (tamaño del amplicón: ~170 pb). **1.** Marcador de peso molecular de 100 pb; **2.** M2235; **3.** M1241; **4.** M3337; **5.** M712; **6.** M2438; **7.** M1564; **8.** M99A; **9.** MM942; **10.** M748; **11.** M1553; **12.** M1563; **13.** M811; **14.** M3320; **15.** M313; **16.** M2783.

Una vez se observó la pureza del ADN se realizó la Detección del Virus de Papiloma Humano (VPH) mediante Reacción en cadena de la polimerasa.

Todas las 15 muestras fueron evaluadas para la detección del virus de papiloma humano, mediante PCR convencional. Los resultados aparecen en la Figura 3.

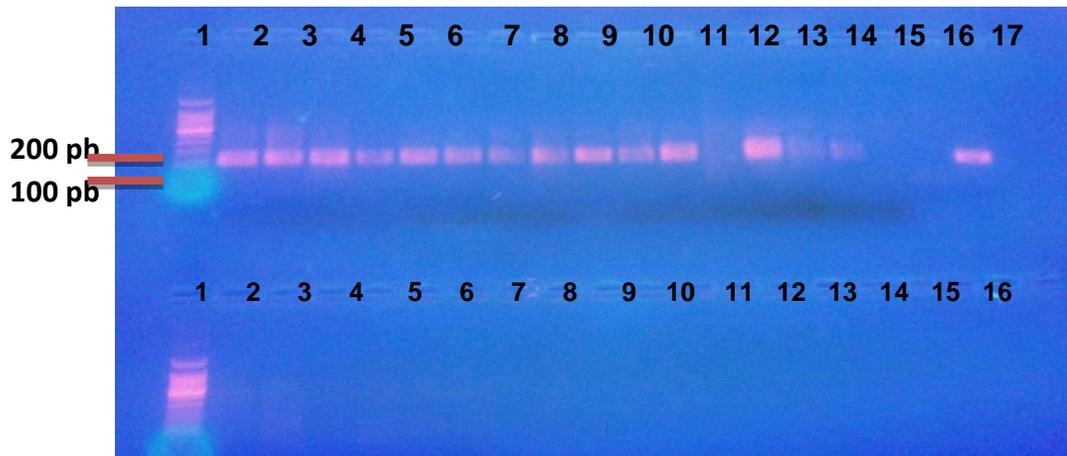
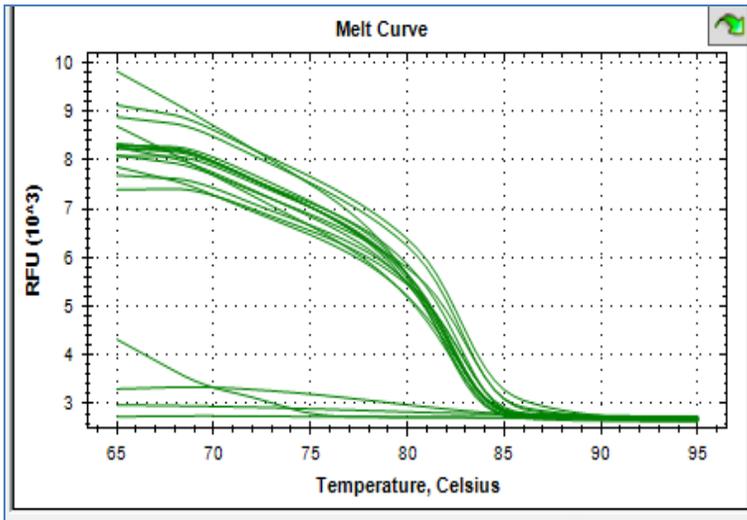
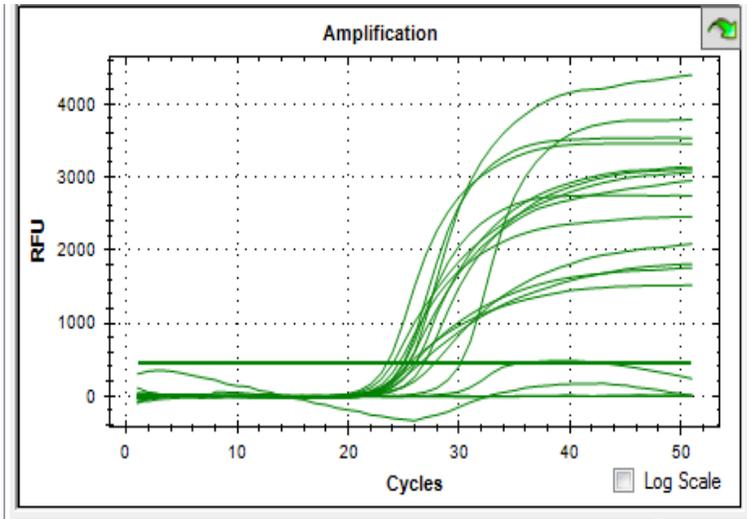
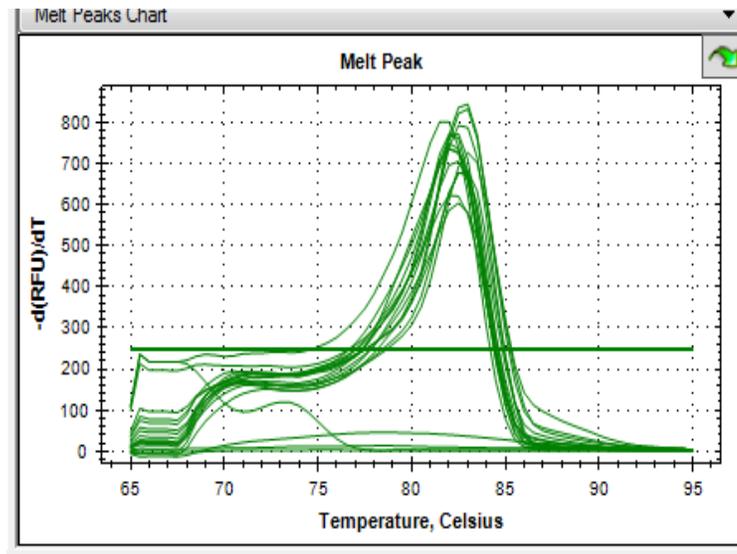


Figura 3. A. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % productos amplificados de PCR con los primers **PCO3/PCO4** (tamaño del amplicón: ~170 pb). 1. Marcador de peso molecular 100 pb. 2. M2235. 3. M1241. 4. M3337. 5. M712. 6. M2438. 7. M1564. 8. M99A. 9. MM942. 10. M748. 11. M1553. 12. M1563. 13. M811. 14. M3320. 15. M313. 16. M2783. 17. GP5+/GP6+ células Hella. **B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % productos amplificados de PCR con los primers **GP5+/GP6+** (tamaño del amplicón: ~170 pb). 1. Marcador de peso molecular 100 pb. 2. M2235. 3. M1241. 4. M3337. 5. M712. 6. M2438. 7. M1564. 8. M99A. 9. MM942. 10. M748. 11. M1553. 12. M1563. 13. M811. 14. M3320. 15. M313. 16. M2783.

Al realizar la PCR convencional ninguna de las muestras demostraron amplificación utilizando el set de cebadores GP5+ y GP6+. Por esta razón decidimos confirmar estos datos.

Para confirmar los resultados obtenidos, se realizó la amplificación del gen B-globina por PCR en tiempo real utilizando SybrGreen en el equipo Biorad teniendo las mismos pasos de amplificación que la PCR convencional y confirmando el producto específico con curvas melting. Los resultados obtenidos para la PCR en tiempo real aparecen en las figuras 4-6.





Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
A02	SYBR	B-Actina	Unkn	1241	N/A
A03	SYBR	B-Actina	Unkn	3337	24,50
A04	SYBR	B-Actina	Unkn	912	30,10
A05	SYBR	B-Actina	Unkn	2438	26,81
A06	SYBR	B-Actina	Unkn	1564	24,94
A07	SYBR	B-Actina	Unkn	99A	26,43
A08	SYBR	B-Actina	Unkn	942	25,90
B01	SYBR	B-Actina	Unkn	748	25,04
B02	SYBR	B-Actina	Unkn	1553	27,71
B03	SYBR	B-Actina	Unkn	1563	24,02
B04	SYBR	B-Actina	Unkn	811	N/A
B05	SYBR	B-Actina	Unkn	3320	25,41

Completed

Scan Mode: All Channels

Plate

Melt Curve Summary Results Grid						
Well	Fluor	Target	Content	Sample	Melt Temp	
A02	SYBR	B-Actina	Unkn	1241	83,00	
A03	SYBR	B-Actina	Unkn	3337	82,50	
A04	SYBR	B-Actina	Unkn	912	82,00	
A05	SYBR	B-Actina	Unkn	2438	82,00	
A06	SYBR	B-Actina	Unkn	1564	82,00	
A07	SYBR	B-Actina	Unkn	99A	82,00	
A08	SYBR	B-Actina	Unkn	942	83,00	
B01	SYBR	B-Actina	Unkn	748	83,00	
B02	SYBR	B-Actina	Unkn	1553	83,00	
B03	SYBR	B-Actina	Unkn	1563	82,50	
B04	SYBR	B-Actina	Unkn	811	None	

te Type: BR Clear | Analysis Mode: Baseline Subtracted Curve Fit

Al no haber identificación de la presencia de VPH en ninguna de las muestra , la prevalencia para el 2009 fue de cero. Finalizando el estudio en esta etapa debido a que al no haber presencia del virus no se puede hacer tipificación..

7. DISCUSIÓN

El virus del papiloma humano (VPH) es asociado con una variedad de tumores benignos y malignos, entre éste último se encuentran los de la Mucosa oral y Cervical, los de alto riesgo viral son frecuentemente encontrados en Carcinomas de diferentes sitios al de cérvix, como son el área de Cabeza y cuello⁷¹ su conocimiento es importante para la determinación, prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la patología⁷². Dentro de los factores que se identifican asociados al Carcinoma Escamocelular Oral están el tabaco y el alcohol⁷³. Sin embargo en los últimos años se ha evidenciado la implicación del VPH como un factor determinante en el desarrollo de lesiones Premalignas y de Cáncer Oral.

En éste estudio se ha explorado la presencia de dos tipos de VPH de alto riesgo (tipo 16 y tipo18) usando la Reacción en Cadena Polimerasa (PCR) convencional e incluyendo una PCR en tiempo real para confirmación, en 15 bloques de parafina de pacientes con diagnóstico de carcinoma oral, encontrando una prevalencia de cero para la presencia de VPH y tipos de VPH. Estos datos son similares a los descritos por Braga Ribeiro et al en el 2011 donde reportaron una prevalencia del 0 % de VPH en Carcinoma Oral en un estudio realizado en 2 regiones de alta incidencia de Cáncer de Cabeza y Cuello⁷⁴ y por Correa Rivero et

⁷¹ LUCA SCAPOLI, et al. Low prevalence of human papillomavirus in squamous-cell carcinoma limited to oral cavity proper. EN: Modern Pathology.2009, vol.22,p. 366–372.

⁷² NAKAMORI K, et al. p. 1116-8.

⁷³ Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. Curr Opin Oncol 2009;21:194–200

⁷⁴ BRAGA RIBEIRO KARINA, et al. 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. 2011, vol.40, p.489–502

al, quienes en el 2006 no observaron ninguna amplificación del VPH en ninguna de las 40 muestras de Cáncer Oral estudiadas⁷⁵. Y difieren de los estudios que reportaron alguna prevalencia, como el de Luca Scapoli, et al en el 2009, donde reportan un resultado del 2% de prevalencia en 314 muestras de Cavidad Oral exclusivamente⁷⁶. Patrick K. Ha, et al en el 2002 en un estudio de 102 muestras de Carcinoma Escamocelular de Cabeza y Cuello reportaron un porcentaje de 2.9% correspondiente a la presencia del VPH en las muestras de Cavidad Oral⁷⁷. Sin embargo Anaya-Saavedra et al en 2008 obtuvieron una prevalencia del VPH para los 62 casos de cáncer oral de 43.5%, mostrando además que los tipos de VPH 16 y 18 fueron los más frecuentes⁷⁸ y Quintero k. et al en el 2013 en un estudio retrospectivo sobre bloques parafinados de casos de Carcinomas Escamocelulares de Cabeza y Cuello realizado en Colombia, reportaron una prevalencia de VPH de casi el 20%, en el que el 23,9% correspondió a Carcinomas de Cavidad Oral, por encima de zonas laríngeas y orofaríngeas⁷⁹.

Dentro del análisis realizado encontramos que la distribución del Carcinoma Escamocelular Oral por sexo reporta 6 personas del sexo femenino y 9 del sexo masculino, datos similares a los revelados por Westra W. y así como también

⁷⁵OP cit, RIVERO ER AND NUNES FD., p.21-4.

⁷⁶ SCAPOLI LUCA, et al. Low prevalence of human papillomavirus in squamous-cell carcinoma limited to oral cavity proper. EN: Modern Pathology. 2009. Vol, 22, p. 366–372

⁷⁷ PATRICK K, et al. Real-Time Quantitative PCR Demonstrates Low Prevalence of Human Papillomavirus Type 16 in Premalignant and Malignant Lesions of the Oral Cavity. EN: Clinical Cancer Research. May 2002. Vol. 8, p. 1203–1209,

⁷⁸ 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.

⁷⁹ QUINTERO K, et al. P. 375-81

otros estudios^{80 81 82}. Dentro de los hallazgos encontrados en el presente estudio reportamos que las edades oscilaron entre los 40 y 90 años, clasificados en su mayoría como adultos mayores de los que aunque no se obtuvieron datos sobre su comportamiento sexual, se podría justificar la no presencia del VPH en nuestras muestras porque la inclusión de prácticas sexuales de alto riesgo ha mostrado una tendencia al aumento en la actualidad. D'Souza et al en el 2007 reportaron que el grado de asociación entre el VPH y el Cáncer Oral y Orofaringeo incrementó con el número de parejas con sexo vaginal y sexo oral, sexo casual, edad temprana para iniciar relaciones sexuales, uso infrecuente de condones; descrito en edades menores de 50 años con un numero de 34 pacientes, entre los 50 y 64 años con un numero de 51 pacientes y mayores de 65 años en número de 15 , en una muestra total de 100 . La relación entre VPH y cáncer Cervical indica que el comportamiento sexual de alto riesgo y la exposición a la infección con VPH incrementará el riesgo de otros canceres causados por VPH ⁸³ . mientras que Herrero et al en 2003 observaron una asociación menos marcada entre los indicadores de comportamiento sexual tales como número de parejas sexuales a lo largo de la vida, prácticas de sexo oral y el Cáncer Oral ; describiendo así mismo que los pacientes con Cáncer Oral en su mayoría fueron mayores de 65 años, que la frecuencia de sexo oral en 881 personas con cáncer oral fue de “nula” y de 25 personas con esta patología fue de ” la mayoría del tiempo” y respecto al número de parejas sexuales a lo largo de su vida, reportaron que 807 pacientes con cáncer Oral tuvieron entre 0 y 1 pareja mientras que 21 personas con cáncer oral tuvieron a lo largo de su vida más de 100 parejas . Además detectaron la

⁸⁰ Op cit. PATRICK K , et al., p. 1203–1209,

⁸¹ HERRERO ROLANDO, et al. Human Papillomavirus and Oral Cancer: The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. EN: Journal of the National Cancer Institute, 2003. Vol. 95, No. 23, p. 1772-1783.

⁸² GYPSYAMBER D'SOUZA, et al. Case–Control Study of Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. EN: N Engl J Med. 2007. vol.356, p. 1944-56.

⁸³ Ibid, p. 1944-56.

presencia de VPH en biopsias de cáncer más frecuentemente entre estos sujetos anteriormente mencionados⁸⁴ .

En relación a que la muestra del presente estudio estuvo compuesta exclusivamente de Carcinomas Escamocelulares Orales Infiltrantes en su variante Epidermoide , Escapoli et al en el 2009 reportan que aunque no se descarta el posible papel del VPH en Carcinomas Escamocelulares Orales, especialmente en el contexto del mecanismo conocido como “hit and run“, hay que destacar que en la orofaringe, donde el VPH tiene una alta prevalencia, el virus también es detectable en tumores avanzados ⁸⁵. Y aunque algunos estudios sobre prevalencia de VPH incluyen lesiones premalignas en sus muestras como Patrick K. et al en el 2002 y los investigadores anteriormente mencionados encontraron aún notables variaciones en ésta ^{86,87}. Respecto al subtipo morfológico (Epidermoide) y a la mayor distribución del sitio anatómico (Paladar) de las muestras del presente estudio M.W Lingel et al.en el 2012 incluyeron casos consecutivos retrospectivos de los archivos de patología de bloques de parafina, patológicamente diagnosticados como Carcinomas Escamocelulares en sus diferentes subtipos, reportando al Epidermoide (convencional) con el mayor número de casos pero al subtipo Basaloide con el mayor número de muestras positivas para VPH; revelando además que la distribución del sitio anatómico no difiere de casos negativos para VPH (14) y en el estudio del 2006 de Correa Rivero et al donde el Paladar fue el sitio menos frecuente en distribución y el labio el más frecuente, ninguno de los casos mostro amplificación del ADN viral⁸⁸ .

⁸⁴ Op cit, HERRERO ROLANDO, et al., p. 1772-1783.

⁸⁵Op cit, SCAPOLI LUCA, et al. p. 366–37

⁸⁶ Ibid, p 366-37.

⁸⁷Op cit, PATRICK K , et al., p. 1203–1209,

⁸⁸ OP cit, RIVERO ER AND NUNES FD., p.21-4.

Aunque la muestra estudiada con Carcinoma Escamocelular del 2009 fue baja de 15 bloques, no justifica la no prevalencia de VPH si lo comparamos con el estudio de 52 pacientes reportados por Zhao et al que en el 2009 determinó una prevalencia del 40.4% de los diagnosticados con carcinoma Escamocelular Oral⁸⁹ y con el estudio de Braga Ribeiro et al en el 2011, donde la prevalencia fue de 0% en los 50 casos de cavidad oral seleccionados así mismo de acuerdo con el método de detección por PCR⁹⁰. Mientras que muestras relativamente altas como la reportada por Herrero et al en el 2003, con un número de 766 arrojaron una prevalencia de 3.9%⁹¹. Toda esta variabilidad en la frecuencia de infección por VPH, que ha sido descrita por diversos autores, va de 0 al 100%^{92 93 94}. Esta variabilidad inherente en los métodos de detección y muestreo, con sus fluctuaciones aleatorias por la limitación de tamaño, exacerbando así mismo dicha variabilidad⁹⁵, ha hecho que sea difícil estimar la prevalencia del VPH en mucosa normal, lesiones premalignas y éstos tumores invasivos⁹⁶, arrojando resultados contradictorios referentes a la asociación entre VPH y cáncer oral⁹⁷. Además la muestra estuvo bien definida como Carcinoma Escamocelular limitada a la Cavidad Oral y como es bien conocida la infección por VPH es la principal causa

⁸⁹DAN ZHAO, et al. Human Papillomavirus as an Independent Predictor in Oral Squamous Cell Cancer. EN: Int J Oral Sci. 2009. Vol. 1, no.3, p. 119–125.

⁹⁰ Op cit, BRAGA RIBEIRO KARINA, et al. p.489–502

⁹¹ Op cit, HERRERO ROLANDO, et al., p. 1772-1783.

⁹² HA PK and CALIFANO JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. EN: Crit Rev Oral Biol Med. 2004, vol. 15, p. 188-196

⁹³ 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: Clin Cancer Res. 2002, vol,8, p.1203-1209.

⁹⁴ OP cit, RIVERO ER AND NUNES FD., p.21-4.

⁹⁵ Op cit, SCAPOLI LUCA, et al., p. 366–372

⁹⁶ Op cit, PATRICK K. HA, et al. p.1203-1209.

⁹⁷ OP cit, RIVERO ER AND NUNES FD., p.21-4.

de un subconjunto de Carcinomas Escamocelulares pero Orofaringeos y el papel de éste virus en Carcinomas Orales aún sigue siendo controversial⁹⁸. M.W Lingel et al. en el 2012 incluyeron en su estudio exclusivamente bloques de parafina de casos consecutivos retrospectivos de la Cavidad Oral procedentes de los archivos de patología diagnosticados como Carcinomas Escamocelulares en sus diferentes variantes⁹⁹.

La evidencia molecular apoya el papel del VPH en la patogénesis del Carcinoma de Células Escamosas en Orofaringe con tasas medias de prevalencia que van del 12% al 70%¹⁰⁰, mientras que el Carcinoma de la Cavidad Oral muestra una tasa de prevalencia más baja, entre 3 y 15%¹⁰¹. Para determinar la presencia o ausencia del ADN del VPH se utilizó la evidencia molecular de PCR convencional; y mientras que Hansson B.G et al en el 2005 manifestaron que han surgido muchos estudios basados en que la Reacción en Cadena Polimerasa ha reportado una más alta prevalencia que otras técnicas menos sensibles tales como el Southern blot o hibridación in situ¹⁰², otros autores como SCAPOLI L., et al en el 2009 revelaron dificultades con esta técnica como la extrema sensibilidad a la contaminación; sin embargo esto puede simplemente reflejar inconvenientes metodológicos inherentes; ellos refieren que incluso la extracción cuidadosa del tejido y la manipulación no necesariamente previene la contaminación y puede ser

⁹⁸ LINGEN MW, et al. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. EN: Oral Oncol. 2013 Jan, vol.49, no.1, p.1-8.,

⁹⁹ Ibid, p.1-8

¹⁰⁰ CHARFI L, et al. Two types of squamous cell carcinoma of the palatine tonsil characterized by distinct etiology, molecular features and outcome. EN: Cancer Lett.2008, vol.260, p.72-78.

¹⁰¹ Op cit, SCAPOLI LUCA, et al., p. 366-372

¹⁰² HANSSON BG, et al. Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. Acta Otolaryngol.2005, vol.125, p. 1337-1344.

prácticamente imposible eliminar o explicar utilizando técnicas convencionales ¹⁰³. En el resultado del presente estudio se observó la presencia de 5 bandas pero tenues, por lo que se adoptó la realización de una PCR en tiempo real como método que asegura una alta sensibilidad y ofrece la posibilidad de excluir resultados falsos positivos¹⁰⁴ así como también se incluyó un control positivo de la línea celular Hella. La inclusión de un control positivo en la PCR es muy importante para descartar la posibilidad de falsos negativos. Así si es negativo el control para detectar cualquier posibilidad de resultado falso positivo por contaminación durante el procedimiento de PCR¹⁰⁵. Y Aunque nuestras muestras en su totalidad estuvieron embebidas en parafina por un lapso de tiempo , estudios realizados en el 2012 por Mark W Lingen et al revelan que la degradación del ADN en parafina puede reducir la sensibilidad de la detección de VPH lo que daría lugar a una subestimación de la fracción etiológica; además observaron un descenso significativo en el rendimiento en el ADN con el aumento del tiempo desde el diagnóstico, pero la Calidad y la Cantidad permaneció muy por encima de la necesaria para que la muestra fuera evaluable ¹⁰⁶. Así mismo Scapoli L. et al manifestaron que también es posible que la extracción de ADN a partir de tejido embebido en parafina puede disminuir la probabilidad de detección pero además en su estudio el VPH tampoco fue detectado en las 44 muestras de pares coincidentes de tejido fresco congelado, lo que implica que la técnica de procesamiento de tejidos no afecto los resultados¹⁰⁷.

¹⁰³Op cit, SCAPOLI LUCA, et al, p. 366–372

¹⁰⁴ Ibid, p. 366-72.

¹⁰⁵ OP cit, RIVERO ER AND NUNES FD., p.21-4.

¹⁰⁶ Op cit, LINGEN MW, et al., p.1-8.,

¹⁰⁷ Op cit, SCAPOLI LUCA, et al., p. 366–372

El estudio tomo como referencia para determinar la prevalencia de VPH el resultado arrojado del análisis de la PCR en tiempo real. Por lo cual en las bandas tenues no se exploró la presencia de los serotipos. Las limitaciones del estudio estuvieron en la obtención de las historias clínicas de los pacientes con diagnóstico de cáncer oral para la correlación con los hábitos, procedencia así mismo de ninguna exploración sobre prácticas de sexo oral.

8. CONCLUSION

En este estudio se evidencio que la prevalencia de VPH en esta serie de muestras de bloques de parafina de los pacientes diagnosticados con Carcinoma Oral fue de cero. A pesar de la no prevalencia de VPH en cáncer oral aún hay controversias en cuanto a la presencia del virus y su papel en la carcinogénesis.

En la identificación del VPH, la PCR la convencional y la de tiempo real, demostraron ser de gran ayuda porque excluyen en forma fiable muestras contaminadas y aquellos con mínimo contenido de ADN del VPH.

En nuestra Cavidad Oral, el Cáncer Oral es una enfermedad que amenaza la vida. Los resultados obtenidos muestran la importancia y la necesidad de identificar la prevalencia no solo del virus, sino de conocer el comportamiento epidemiológico de este tipo de Cánceres en nuestra región y evaluar su patrón etiológico cambiante, con el fin de establecer mejores alternativas en la información y educación de nuestra población sobre los signos y síntomas y sobre todo de factores de riesgo del Cáncer Oral, variables que también son responsables de una detección tardía que impide un mejor pronóstico y rápido tratamiento.

9. RECOMENDACIONES

Son necesarios más estudios sobre un mayor número de muestras de pacientes de los cuales se puedan obtener datos sobre sus hábitos de alcohol y tabaco, así como de sus prácticas sexuales.

BIBLIOGRAFIA

BOSCH FX, DE SANJOSE S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. EN: Dis Markers. 2007, vol.23, no.4. p. 213-27

BRAGA RIBEIRO KARINA, et al. 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. 2011, vol.40, p.489-502

BRAGA RIBEIRO KARINA, et al. 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. 2011, vol.40, p.489-502

CHARFI L, et al. Two types of squamous cell carcinoma of the palatine tonsil characterized by distinct etiology, molecular features and outcome. EN: Cancer Lett.2008, vol.260, p.72-78.

Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. Curr Opin Oncol 2009;21:194-200

DAN ZHAO, et al. Human Papillomavirus as an Independent Predictor in Oral Squamous Cell Cancer. EN: Int J Oral Sci. 2009. Vol. 1, no.3, p. 119-125.

DE SANJOSE S, et al. Geographic variation in the prevalence of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus and risk factors for transmission. EN: J Infect Dis. 2009 May. Vol.199, no.10, p.1449-56

GALVÃO CASTRO THEREZITA AND IVO BUSSOLOTI FILHO. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. EN: Rev Bras Otorrinolaringol. 2006; vol.72, no.2, p.272-82

GYPSYAMBER D'SOUZA, et al. Case-Control Study of Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. EN: N Engl J Med. 2007. vol.356, p. 1944-56.

HA PK and CALIFANO JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. EN: Crit Rev Oral Biol Med.2004, vol. 15, p. 188-196

HANSSON BG, et al. Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol.* 2005, vol.125, p. 1337–1344.

HERRERO ROLANDO, et al. Human Papillomavirus and Oral Cancer: The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. *EN: Journal of the National Cancer Institute*, 2003. Vol. 95, No. 23, p. 1772-1783.

http://www.medicinenet.com/pcr_polymerase_chain_reaction/article.htm

HWANG LY, et al. Factors that influence the rate of epithelial maturation in the cervix in healthy young women. *EN: J Adolesc Health*. 2009 Feb. vol.44. no.2, p.103-10

IAMAROON A and KRISANAPRAKORNKIT S. Overexpression and activation of Akt2 protein in oral squamous cell carcinoma. *EN: Oral Oncol*. 2009 October. Vol. 45, no.10, p.175-9

ISLAMI F, et al. Oesophageal cancer in Golestan Province, a high-incidence area in northern Iran - a review. *EN: Eur J Cancer*. 2009 December. Vol.,45 no.18, p.3156-65

JENG CJ, et al.. Prevalence of cervical human papillomavirus in Taiwanese women. *EN: Clin Invest Med*. 2005 October. Vol, 28, no.5, p.261-6.

JO S, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in oropharyngeal squamous cell carcinomas treated in a prospective phase II clinical trial. *Anticancer Res*. 2009 May. vol, 29, no.5, p.1467-74.

JUNQUERA L, et al.. Synchronous oral squamous cell carcinoma and extramedullary plasmacytoma of the tonsil. *EN: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 September. Vol,108, no.3, p.413-6

KADEMANI D, et al. Angiogenesis and CD34 expression as a predictor of recurrence in oral squamous cell carcinoma. EN: J Oral Maxillofac Surg. 2009 September. Vol.67, no.9, p. 1800-5.

KHAN Z, et al. Detection of survivin and p53 in human oral cancer: correlation with clinicopathologic findings. Head Neck. 2009 August. Vol,31, no.8, p.1039-48

KMK MASTHAN, et al. Advanced Diagnostic Aids in Oral Cancer. EN: Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2012, Vol 13

KOVACIC MB, et al. Epidemiologic analysis of histologic cervical inflammation: relationship to human papillomavirus infections. EN: Hum Pathol. 2008 July. Vol.39, no.7, p. 1088-95

KRUSE AL and GRATZ KW. Oral carcinoma after hematopoietic stem cell transplantation--a new classification based on a literature review over 30 years. EN: Head Neck Oncol. 2009. Vol.1, no.29.

KULASEKARA KK, et al. Cancer progression is associated with increased expression of basement membrane proteins in three-dimensional in vitro models of human oral cancer. EN: Arch Oral Biol. 2009 October. Vol.54, no.10, p. 924-31.

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

LEE YC, et al. Active and involuntary tobacco smoking and upper aerodigestive tract cancer risks in a multicenter case-control study. EN: Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009 December, vol.18, no.12, p.3353-61.

LINGEN MW, et al. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. EN: Oral Oncol. 2013 Jan, vol.49, no.1, p.1-8.

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

LUCA SCAPOLI, et al. Low prevalence of human papillomavirus in squamous-cell carcinoma limited to oral cavity proper. EN: Modern Pathology.2009, vol.22,p. 366–372.

LUO CW, ROAN CH, and LIU CJ. Human papillomaviruses in oral squamous cell carcinoma and pre-cancerous lesions detected by PCR-based gene-chip array. EN: Int J Oral Maxillofac Surg. 2007 February, vol.36, no.2, p.153-8.

MAROCCHIO LS, et al. Oral squamous cell carcinoma: an analysis of 1,564 cases showing advances in early detection. EN: J Oral Sci. vol.52, no.2, p.267-73.

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.

MENDENHALL WM and LOGAN HL. Human Papillomavirus and Head and Neck Cancer. EN: Am J Clin Oncol. 2009 Jul 31.

MICHIELS K, et al. Carcinoma cell-derived chemokines and their presence in oral fluid. EN: Eur J Oral Sci. 2009 August, vol.117, no.4, p. 362-8.

MOSLEH-SHIRAZI MS, MOHAMMADIANPANAHI M and MOSLEH-SHIRAZI MA. Squamous cell carcinoma of the oral tongue: a 25-year, single institution experience. EN: J Laryngol Otol. 2009 January, vol.123, no.1, p.114-20.

NAIR S and PILLAI MR. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. Oral Dis. 2005 November, vol.11, no.6, p. 350-9.

NAKAMORI K, et al. Carcinoma ex pleomorphic adenoma of the buccal region is composed of salivary duct carcinoma and squamous cell carcinoma components. EN: Int J Oral Maxillofac Surg. 2009 October, vol. 38, no.10, p. 1116-8.

NDIAYE IC, et al. Squamous carcinoma of the hypopharynx in children in Senegal: between disarray and enigma. EN: Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2009 March, vol.73, no.3, p. 357-61

NEUFCEUR PE, et al. [Involvement of human papillomavirus in upper aerodigestive tracts cancers]. Bull Cancer. 2009 October, vol.96, no.10, p.941-50.

NIELSEN A, et al. Type-specific HPV infection and multiple HPV types: prevalence and risk factor profile in nearly 12,000 younger and older Danish women. EN: Sex Transm Dis. 2008 March, vol.35, no.3, p. 276-82.

NOVAKOVA V and LACO J. [Role of human papillomavirus in carcinogenesis of head and neck cancer]. Klin Onkol. 2008, vol. 21, no.4, p. 141-8

OLIVEIRA MC, et al. High-risk human papillomavirus (HPV) is not associated with p53 and bcl-2 expression in oral squamous cell carcinomas. EN: Auris Nasus Larynx. 2009 August, vol.36, no.4, p. 450-6

ORTHOLAN C, et al. Oral cavity squamous cell carcinoma in 260 patients aged 80years or more. EN: Radiother Oncol. 2009 December, vol.93, no.3, p. 516-23.

PALEFSKY J. Biology of HPV in HIV infection. EN: Adv Dent Res. 2006, vol.19, no.1, p. 99-105.

PALEFSKY J. Human papillomavirus-related disease in people with HIV. EN: Curr Opin HIV AIDS. 2009 January, vol.4, no.1, p. 52-6.

PANIZZA B. Prognostic factors and the treatment of the negative neck in oral carcinoma. EN: ANZ J Surg. 2009 Jan-Feb, vol.79, no.1-2, p. 7-8.

PARKINS GE, ARMAH GA and TETTEY Y. Orofacial tumours and tumour-like lesions in Ghana: a 6-year prospective study. EN: Br J Oral Maxillofac Surg. 2009 October, vol.47, no7, p. 550-4.

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.

PATRICK K , et al. Real-Time Quantitative PCR Demonstrates Low Prevalence of Human Papillomavirus Type 16 in Premalignant and Malignant Lesions of the Oral Cavity. EN: Clinical Cancer Research. May 2002. Vol. 8, p. 1203–1209.

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: Clin Cancer Res. 2002, vol,8, p.1203-1209.

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

PIAO Y, et al.. Evaluation of 18F FDG PET/CT for diagnosing cervical nodal metastases in patients with oral cavity or oropharynx carcinoma. EN: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009 December, vol.108, no.6, p. 933-8.

PINHEIRO RDOS S, et al. Human papillomavirus in the oral cavity of children. EN: J Oral Pathol Med. February, vol.40, no.2, p.121-6.

PITIYAGE G, et al. Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. J Oral Pathol Med. 2009 November, vol.38, no.10, p. 737-52.

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

RAHKOLA P, et al. Association between high risk papillomavirus DNA and nitric oxide release in the human uterine cervix. EN: Gynecol Oncol. 2009 Aug. vol, 114, no.2, p.323-6.

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.

RANKIN KV, et al. Oral health in cancer therapy. EN: Tex Dent J. 2009 May, vol.126, no.5, p. 389-97, 406-19, 22-37.

RAZAK AA, et al. Oral cancer presentation among Malay patients in hospital Universiti Sains Malaysia, Kelantan. EN: Asian Pac J Cancer Prev. 2009, vol.10, no.6, p. 1131-6.

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.

RIVERO ER AND NUNES FD. HPV in oral squamous cell carcinomas of a Brazilian population: amplification by PCR. EN: Braz Oral Res. 2006 Jan-Mar, vol.20, no.1, p.21-4.

SAGHRAVANI N, et al . Low prevalence of high risk genotypes of human papilloma virus in normal oral mucosa, oral leukoplakia and verrucous carcinoma. EN: Acta Odontol Scand. November, vol.69, no.6, p. 406-9.

SAHEBJAMEE M, et al. Human papillomavirus in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma. EN: Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2009 October, vol.14, no.10, p. 525-8.

SARKOLA M, et al. Human papillomavirus DNA detected in breast milk. EN: Pediatr Infect Dis J. 2008 June, vol.27, no.6, p. 557-8

SCAPOLI LUCA, et al. Low prevalence of human papillomavirus in squamous-cell carcinoma limited to oral cavity proper. EN: Modern Pathology. 2009. Vol, 22, p. 366–372

SCARDINA GA, PISANO T and MESSINA P. [Oral and cervical lesions associated with human papillomavirus]. EN: *Recenti Prog Med.* 2009 May, vol.100, vol.5, p.261-6.

SCHULZ M, et al . [Smokeless tobacco: a new risk factor for oral health? A review]. EN: *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2009, vol. 119, no.11, p.1095-109.

SCULLY C and BAGAN JV. Recent advances in oral oncology 2008; squamous cell carcinoma imaging, treatment, prognostication and treatment outcomes. EN: *Oral Oncol.* 2009 June, vol.45, no.6, p. 25-30.

ZUR HAUSEN H. Papillomavirus and p53. *Nature.* 1998 May 21, vol. 393, no.6682, p. 217.

