

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

POSTGRADO DE CIRUGÍA BUCAL

**IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN DE VIRUS EPSTEIN BARR Y VIRUS
PAPILOMA HUMANO EN CARCINOMA ESPINOCELULAR BUCAL Y
BUCOFARÍNGEO**

AUTOR: OD. MAGLENY HERNANDEZ ALEZARD

TUTOR: DRA. MARIA CORRENTI

CARACAS MAYO 2009

INDICE GENERAL

| | Páginas |
|---|----------------|
| Resumen | v |
| Introducción | 1 |
| Antecedentes de la Investigación | 3 |
| Materiales y Métodos | 54 |
| Resultados | 70 |
| Discusión | 95 |
| Conclusiones | 115 |
| Referencias Bibliográficas | 117 |

INDICE DE TABLAS

| Tabla | Páginas |
|---|----------------|
| Tabla 1 Primeras cinco causas de mortalidad en Venezuela. | 3 |
| Tabla 2 Clasificación de la Organización Mundial De La Salud (OMS) Para Tumores de la Cavityad Bucal y Orofaringe | 11 |
| Tabla 3 Clasificación TNM para Carcinomas de la Cavityad Bucal y Orofaringe | 12 |
| Tabla 4 Diagnósticos diferenciales entre carcinoma adenoescamoso y carcinoma epidermoide de cabeza y cuello | 23 |
| Tabla 5 Resultado de varios estudios de detección de VPH en biopsias en parafina de CAECCC en Sitios no específicos, utilizando RCP e Hibridación <i>in situ</i> | 51 |
| Tabla 6 Resultado de varios estudios de detección de VPH en biopsias en parafina de CAEC en Cavityad bucal, utilizando RCP e Hibridación <i>in situ</i> | 52 |
| Tabla 7 Métodos de estudio y prevalencia por Tipo de VPH en CAECCB según localización Geográfica y estudio | 53 |

| | |
|---|----|
| Tabla 8 Estudios CAECCC según localización, sitio geográfico del estudio y prevalencia de VPH | 53 |
| Tabla 9a Distribución de los pacientes con diagnóstico de carcinoma espinocelular según la localización de la lesión | 74 |
| Tabla 9b Distribución de los pacientes con diagnóstico de displasia epitelial según la localización de la lesión | 74 |
| Tabla 10 Distribución de la infección por VEB en las muestras de pacientes con carcinoma espinocelular, displasia epitelial y grupo control | 82 |
| Tabla 11 Distribución de la infección por VPH en la muestra de pacientes con carcinoma espinocelular, displasia epitelial y grupo control | 87 |
| Tabla 12 Relación entre diagnóstico histopatológico e infección por VPH en el grupo de pacientes con carcinoma espinocelular | 91 |
| Tabla 13 Relación entre diagnóstico histopatológico e infección por VPH en el grupo de pacientes con displasia epitelial | 91 |
| Tabla 14 Distribución de la muestra de los pacientes con carcinoma espinocelular o displasia epitelial | |

según genotipos de VPH 93

Tabla 15
Presencia de infección por diferentes tipos
de VPH en la muestra estudiada según el
riesgo oncogénico 94

INDICE DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--|---------------|
| Figura 1 Cortes histológicos de biopsias de Carcinoma espinocelular y displasia epitelial | 24 |
| Figura 2 Tasas de incidencia y mortalidad de los Tumores de la cavidad bucal y faringe | 26 |
| Figura 3 Incidencia global de los tumores de La cavidad bucal y bucofaringe | 28 |
| Figura 4 Distribución de los pacientes con Diagnóstico de carcinoma espinocelular o displasia epitelial según rango de edad | 72 |
| Figura 5a Distribución de pacientes con diagnóstico de CAEC según diagnóstico histopatológico | 76 |
| Figura 5b Distribución de pacientes con Diagnóstico displasia epitelial según diagnóstico histopatológico | 76 |
| Figura 6 a Distribución de los pacientes con displasia epitelial según el hábito tabáquico | 77 |
| Figura 6b Distribución de los pacientes con Carcinoma espinocelular según el hábito tabáquico | 78 |
| Figura 7 a Relación entre hábito tabáquico y | |

| | |
|---|----|
| diagnóstico histopatológico en pacientes con carcinoma espinocelular | 79 |
| Figura 7b Relación entre hábito tabáquico y diagnóstico histopatológico en pacientes con displasia epitelial | 80 |
| Figura 8 Detección de Virus Epstein Barr mediante RCP | 81 |
| Figura 9 Relación entre el rango de edad e infección por VEB en los pacientes con displasia epitelial | 83 |
| Figura 10 Relación entre hábito tabáquico e infección por VEB en los pacientes con displasia epitelial | 84 |
| Figura 11 Identificación y tipificación de VPH por medio de ensayo INNO LiPA HPV | 86 |
| Figura 12 a Relación entre hábito tabáquico e infección por VPH en el grupo de pacientes con carcinoma espinocelular | 89 |
| Figura 12 b Relación entre hábito tabáquico e infección por VPH en el grupo de pacientes con displasia epitelial | 89 |

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue identificar y tipificar Virus Epstein Barr y Virus Papiloma Humano en carcinoma espinocelular en cavidad bucal y bucofaringe, con el fin de establecer relación entre la infección viral y los cambios en lesiones potencialmente malignas (displasias) y malignas (carcinoma espinocelular). Entre agosto-2008 y febrero-2009, se obtuvieron 48 muestras de lesiones de displasia epitelial y carcinoma espinocelular de cavidad bucal y bucofaringe de pacientes que asistieron al Servicio de Cabeza y Cuello del Hospital Oncológico Dr. Luis Razetti, al Postgrado de Cirugía Bucal y al Laboratorio Central de Histopatología Dr. Pedro Tinoco, de la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela. Dichos casos fueron distribuidos en 3 grupos: Grupo diagnosticado con carcinoma espinocelular (28 individuos); grupo diagnosticado con displasia epitelial (10 individuos) y Grupo control (10 individuos). A estas muestras se les aplicaron técnicas de biología molecular. Para la identificación y tipificación de VPH se aplicó el ensayo INNO-LiPA genotyping extra, de alta sensibilidad y especificidad. Para la identificación de VEB se aplicó Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), empleando el kit Epstein Barr Virus- BMLF1. Los resultados fueron analizados estadísticamente. En la muestra fue predominante el género masculino (60%) sobre el femenino (39%) con una edad promedio de 52 años, el rango de edad más frecuente fue el de mayores de 50 años. El 78% de los pacientes con diagnóstico de carcinoma y el 80% de los pacientes diagnosticados con displasia resultaron ser fumadores, representando el hábito tabáquico el factor etiológico extrínseco más frecuente. La localización anatómica más común para ambos grupo de estudio fue el reborde alveolar seguido de la bucofaringe. El diagnóstico histopatológico predominante para el grupo carcinoma fue carcinoma espinocelular bien diferenciado, y para el grupo displasia el diagnóstico de displasia epitelial moderada. La infección por VEB alcanzó un 55,6% en el grupo de pacientes con displasias. El VPH se identificó en el 60,7% de los pacientes con carcinoma y en la totalidad de los pacientes con displasia epitelial. El genotipo de VPH más frecuentemente identificado fue el VPH 16, seguido de VPH 18, VPH 6, VPH 11 y VPH 33. Un total de 5 pacientes del grupo displasia presentó coinfección por VEB y VPH. Los resultados de la investigación promueven el desarrollo de nuevos estudios orientados a despejar las incógnitas que persisten en el tema de la participación de las infecciones virales en el desarrollo de carcinomas bucales y bucofaringeos, como también a la ampliación de los recursos del profesional de la odontología y cirujanos bucales en el área de la patología Bucal.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad es aceptado el papel de las coinfecciones por VPH y VEB en la carcinogénesis de células escamosas de cabeza y cuello. Ambos virus son considerados factores de riesgo para el desarrollo de estas neoplasias. Sin embargo reportes recientes como el de Liuzzi y col;(2007) plantean el estudio otros tipos de virus, en especial de VPH, considerados de bajo riesgo, concluyendo que la presencia de VPH en Carcinoma espinocelular de cabeza y cuello se han asociado a una enfermedad de menor agresividad con evidencia de tumores bien diferenciados y en estadios menores, y con pacientes con mejores tasas de sobrevida general y libres de enfermedad.

En otra publicación Correnti y col; (2004) reporta 50% de casos positivos a infección por VPH en una muestra de 18 pacientes con carcinoma espinocelular en cavidad bucal en una población venezolana.

Chiang y col (2008) concluyen que los pacientes con identificación positiva para VPH-16 en los fluidos salivales posterior a tratamiento, presentan alto riesgo de desarrollar recurrencia y metástasis a distancia.

Estos, junto con muchos otros estudios demuestran no solo el papel de las infecciones virales en la génesis de los carcinomas espinocelulares,

sino que proyectan un mayor alcance en la aplicabilidad de estos marcadores como diagnósticos y pronósticos de la evolución de la enfermedad.

Es por lo antes expuesto que se hace necesario continuar investigaciones orientadas a identificar la presencia de patógenos como virus Epstein-Barr y Virus de Papiloma Humano y su rol en el desarrollo del carcinoma espinocelular en cavidad bucal, con la finalidad perfeccionar el conocimiento de la patogénesis de estos tumores, por lo tanto esta investigación plantea como objetivo la detección y tipificación de Virus Papiloma Humano y Virus Epstein-Barr en Carcinoma espinocelular bucal y bucofaríngeo, en los pacientes del Instituto Oncológico “Dr. Luis Razetti” y Laboratorio Central de Histopatología Dr. Pedro Tinoco de La Facultad de Odontología de La Universidad Central de Venezuela.

Alcanzar este objetivo traería importantes aportes para la prevención del cáncer como por ejemplo la implementación de programas de vacunación contra los virus para población de alto riesgo; establecimiento de protocolos de atención que minimicen el riesgo de transmisión iatrogénica entre pacientes; entre otras.

I.- ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

1. - Carcinoma espinocelular o de células escamosas

El cáncer constituye en Venezuela una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad, de tal magnitud, que si una de cada cuatro personas alcanza la edad de 74 años, puede padecer alguna de sus variedades y una de cada siete tiene el riesgo de morir por cáncer.(Capote, 2006)

En la figura 1 se presentan las primeras cinco causas de mortalidad en ambos géneros en Venezuela para el año 2005, de acuerdo a lo publicado en el Anuario de Mortalidad del Ministerio de Sanidad (MS). Como puede observarse el cáncer ocupa el segundo lugar entre las diversas causas de muerte, posición, que ha mantenido en los últimos 25 años, siendo sólo superado por enfermedades del corazón y representando el 15 % de la mortalidad diagnosticada en el país.

Tabla 1 primeras cinco causas de mortalidad en Venezuela. Ambos Géneros. 2005

| Causas de muerte | Mortalidad | % |
|------------------------------|------------|--------|
| 1 Enfermedades del corazón. | 24 353 | 20,71 |
| 2 Cáncer. | 18 155 | 14,93 |
| 3 Enferm. cerebrovasculares. | 8 695 | 7,40 |
| 4 Suicidios y Homicidios. | 8 614 | 7,31 |
| 5 Accidentes de todo tipo. | 8 471 | 7,19 |
| Otras causas | 49 543 | 42,05 |
| Total | 117 831 | 100,00 |

Fuente: anuario de mortalidad 2005. MSDS

Aproximadamente uno de cada tres americanos viven en la actualidad con una enfermedad maligna en desarrollo, según refiere Neville (2002). Alrededor del 54% de estas personas afectadas sobreviven a esta enfermedad; el cáncer causa 552.200 muertes al año en los estados Unidos lo que significa el 20% de mortalidad general en este país.

El cáncer bucal representa más del 3% de todos los cánceres en los Estados Unidos, pero éste es el sexto cáncer más común en hombres y el doceavo en mujeres. En algunos países como la India, éste es el cáncer más común. Aproximadamente el 94% de todas las lesiones malignas en cavidad bucal son Carcinomas espino celulares.

Neville (2003) reporta que entre la población adulta de América del Norte, el carcinoma bucal se encuentra entre las 25 lesiones de la mucosa bucal con mayor prevalencia y que aproximadamente 21.000 nuevos casos son diagnosticados anualmente, provocando más de 6.000 muertes en este país al año.

La Federación Odontológica Latinoamericana, afirma que el cáncer bucal tiene una prevalencia del 5%, y que representa una patología grave con implicaciones psicosociales y económicas importantes, ya que solo el 15% de los casos se diagnostican en etapas tempranas de la enfermedad.

La Organización Mundial de la Salud (2005), define el carcinoma espinocelular o de Células Escamosas (CCE) como una neoplasia epitelial invasiva con distintos grados de diferenciación de las células escamosas y que es propenso a la rápida y extensiva producción de nódulos linfáticos metastáticos, y que ocurre predominantemente en adultos con hábitos tabáquicos y alcohólicos, entre la quinta y sexta década de vida. Compromete a la piel y a las mucosas con epitelio escamoso.

Es el primer cáncer más frecuente de la cavidad bucal, con importante crecimiento de las tasas de incidencia en las últimas décadas, especialmente en inmunodeprimidos.

Su etiopatogenia se considera multifactorial. Muchos estudios identifican como factores de riesgo el hábito tabáquico, el consumo de tabaco masticado, el hábito alcohólico, así como la dieta pobre en betacarotenos y vitamina A, la predisposición genética, la contaminación ambiental entre otros.(Forastiere, 2001; Pintos, 2008; Pérez-Ordoñez, 2006; Ben-Izhak, 2005)

La revista Médica del Instituto Mexicano de Seguro Social en el 2006 reporta que el 80% de los casos de carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal (CACECB) se asociaron a consumo de alcohol y tabaco y que

en la mitad de estos casos hubo asociación con la infección por VPH. Por otra parte los estudios empleando la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) mostraron asociación con CACECB en 69% de los pacientes que consumían tabaco y alcohol, comparado con el 29% de los individuos que no los consumían.

En recientes décadas los datos moleculares y epidemiológicos obtenidos indican la participación de Virus Papiloma Humano y Virus Epstein-Barr como factores coadyuvantes para el desarrollo del CACECB. Adicionalmente están involucrados en mutaciones de distintos genes, especialmente del gen supresor de tumor p53. También puede surgir de novo o de lesiones pre malignas existentes como Leucoplasias Verrugosas proliferativas.

El comportamiento biológico depende de una serie de variables clínico-patológicas tales como: localización; tamaño; características histopatológicas del tumor y si este es localmente invasivo y posee capacidad metastastisante.

2. Signos y síntomas

Los pacientes con pequeños CCE bucales o bucofaríngeos, por lo general se presentan asintomáticos o presentan leves síntomas y mínimas

manifestaciones, es por eso que el profesional debe ser cuidadoso en el examen clínico y muy suspicaz en especial si el paciente refiere hábitos tabáquico y/o alcohólico.

Los pacientes se pueden presentar con lesiones rojas, lesiones mixtas rojas y blancas o con placas (Leucoplasias). Sin embargo muchos pacientes se presentan con signos y síntomas de enfermedad local avanzada. Las características clínicas varían según la zona bucal afectada.

Mucosa recrecida y ulcerada, dolor, dolor referido al oído, halitosis, dificultad para hablar, trismos, dificultad y dolor para masticar y deglutir, sangramiento, y tumoraciones en el cuello, son los síntomas que comúnmente se presentan en carcinomas avanzados de la cavidad oral y bucofarínge.

En ocasiones los pacientes se presentan con nódulos en el cuello sin ningún otro signo ni lesión en la cavidad bucal.

Los casos de carcinoma extremadamente avanzados se presenta como tumoraciones ulceroproliferativas con áreas de necrosis y extendidas hacia estructuras vecinas como hueso, músculos y piel. En los estadios terminales el paciente puede presentar fistulas oro-cutáneas, hemorragias continuas, anemia severa y caquexia.

Según Ben-Izhak y Col; (2005), La ubicación anatómica más común es la lengua usualmente en reborde lateral posterior y en la superficie ventral. El piso de boca es afectado con mayor frecuencia en hombres pero tiende a aumentar su incidencia en los últimos años en mujeres. Otros sitios de aparición de esta lesión, en orden descendente de frecuencia son: paladar blando, encía, mucosa bucal, mucosa labial y paladar duro.

El carcinoma de lengua representa alrededor del 50% de los cánceres intrabucales estudiados en la población Norte americana (Neville, 2002).

Dos de cada tres carcinomas linguales son indoloros. Aparecen como masas induradas o úlceras ubicadas en los bordes laterales de la lengua hacia la parte posterior; 20% se ubican en los bordes laterales anteriores o en la superficie ventral, y solo el 4% ocurre en el dorso de la lengua. La lengua es el sitio involucrado en pacientes jóvenes y, es la única ubicación anatómica donde se ha reportado carcinoma espino celular bucal congénito.

El carcinoma de piso de boca representa el 35% de todos los cánceres intrabucales y se observa un incremento en la frecuencia de éste en mujeres.

De todos los carcinomas intrabucales, los de piso de boca son los más relacionados con inicio en lesiones preexistentes como leucoplasia o eritroplasia. Por otra parte los carcinomas en piso de boca son los más comúnmente asociados con desarrollo de lesiones secundarias en otra área del tracto aerodigestivo o en órganos distantes.

Los carcinomas en reborde alveolar y encía por lo general cursan asintomáticos y mayormente provienen de mucosa queratinizada de la parte posterior de la mandíbula (zona de terceros molares). Estos tumores tienen la especial propiedad de mimetizar inflamaciones benignas o lesiones reactivas, como los granulomas piogénicos, los cuales son muy comunes en la encía.

Cuando el cáncer se desarrolla en áreas edéntulas, pueden tener aspecto de mucosa flácida en relación a los flancos de la dentadura removible y con aspecto superficial de una hiperplasia fibrosa inflamatoria. Los tumores del maxilar en el arco alveolar pueden extenderse hasta el paladar duro. Si el tumor se encuentra adyacente a piezas dentarias, este puede mimetizar una enfermedad periodontal o un granuloma piogénico. Los carcinomas gingivales tienden a destruir la estructura ósea subsiguiente produciendo movilidad dentaria.

El carcinoma del labio inferior usualmente inicia en el borde bermellón y aparece como una lesión indurada o como una ulcera. El carcinoma de labio superior es raro, por lo general se origina de carcinoma de piel.

Los tumores en el paladar duro frecuentemente se presentan como proliferaciones papilares o exofíticas.

En el paladar blando el carcinoma se presenta con aspecto de ulcera con márgenes definidos. En el caso del carcinoma ubicado en las amígdalas tiene aspecto de ulcera o exofítico. En ocasiones este carcinoma se presenta con nódulos linfáticos en el cuello y sin ningún otro signo o síntoma.

3. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud para los tumores de la cavidad bucal y bucofaringe

3.1 Carcinoma Verrugoso

Aunque es poco común, el 75% de todos los casos de Ca verrugoso (CV) ocurren en la cavidad bucal. Esta es una variante exofítica y de lento crecimiento del CCE. Se presenta comúnmente en individuos del sexo masculino y de edad avanzada.

El uso crónico de tabaco masticado es aceptado como el principal factor etiológico del CV bucal. Los tipos 16 y 18 de VPH han sido identificados en más del 40% de CV bucal. El CV bucal comienza como una placa queratósica bien definida y que desarrolla proyecciones papilares o verruguiformes en la superficie. En ocasiones la lesión se presenta eritematosa o con pápulas de color rosa.

La coloración de la lesión depende de la cantidad de queratina producida y del grado de respuesta inflamatoria del huésped hacia el tumor. Es común encontrar queratosis actínica en las mucosas adyacentes en aquellos pacientes que consumen tabaco masticado.

Cuando el tumor no se encuentra infectado o no está lesionando los nervios alveolares, se presenta como una lesión asintomática.

Histopatológicamente el CV consiste en una gruesa capa de epitelio escamoso bien diferenciado y con marcada queratinización que se invagina en el estroma. Las mitosis son raras y se observan en las capas basales. Se observa denso infiltrado linfocítico.

En relación a los diagnósticos diferenciales del CV incluyen CCE exofítico, CV híbrido, CCE papilar, papiloma queratinizante de células escamosas y la verruga vulgar.

En relación al pronóstico y a los factores predictivos: el CV esta caracterizado por un desarrollo lento y localmente invasivo que causa destrucción extensa si no es tratado. El CV puro no posee capacidad metastatisante. En contraste el CV híbrido tiene potencial de producir metástasis, y es por esto que el tratamiento de pacientes con este diagnóstico es similar al manejo de los pacientes con CCE. El CV tiene un excelente pronóstico, se reporta una tasa de sobrevida de cinco años del 85 al 95% en CV laríngeo.

Los pacientes con CV pueden ser tratados quirúrgicamente o con radioterapia, sin embargo la cirugía arroja mejores resultados, pero la radioterapia representa una alternativa a quienes no son candidatos a cirugía.

3.2 Carcinoma Basaloide de células escamosas (CBCE)

El carcinoma basaloide de células escamosas (CBCE) es una variante agresiva y bien diferenciada de CAEC compuesto tanto por componentes escamosos como basaloides.

El CBCE se presenta en ambos sexos, pero es predominante en hombres entre 60 y 80 años. Clínicamente puede presentarse con masas en el cuello, dolor, ronquera, disfagia y sangramiento. Macroscópicamente se presenta como una masa con ulceración central con extensiva sub-mucosa indurada que puede ser confundida con un tumor de glándulas salivales menores o un tumor de tejido blando. En cuanto a la histopatología el CBCE presenta dos componentes: basaloide y células escamosas. Las células basaloides son pequeñas, con núcleos hipercromáticos sin nucléolos y con citoplasma escaso, ellas se encuentran muy juntas, organizadas en un patrón sólido y con configuración lobular, y en algunos casos presentan en la periferia disposición en empalizada.

Hay una característica distintiva del CBCE que no se encuentra en el CCE, son pequeños espacios quísticos que contienen material que reacciona al PAS así como hialinización del estroma. CBCE siempre está asociado a componentes de CCE tales como carcinoma in situ o carcinoma de células escamosas queratinizante invasivo, éstos están usualmente localizados

superficialmente, y quizás solo se presenten como una diferenciación escamosa focal dentro de los islotes basaloideos de tumor. El cruce entre células escamosas y basaloiedes puede ser abrupto.

El CBCE raramente es asociado a componentes de células espinosas. La metástasis puede demostrar carcinoma basaloide, carcinoma escamoso o ambos.

Dentro de los diagnósticos diferenciales del CBCE se encuentran el carcinoma neuroendocrino, carcinoma adenoideo quístico y el carcinoma adeno-esacamoso.

El carcinoma neuroendocrino típicamente no presenta diferenciación de las células escamosas, y tiene una respuesta positiva fuerte a los marcadores endocrinos. El carcinoma adenoideo quístico, especialmente la variante sólida, puede parecerse al CBCE pero el carcinoma adenoideo quístico posee componente mioepitelial y falta en la mayoría de los casos de diferenciación escamosa. Por otra parte, los nódulos linfáticos metastáticos cervicales comunes del CBCE, son muy raros en el CA adenoideo quístico. Los adenocarcinomas y carcinomas adenoescamosos se pueden diferenciar del CBCE por la presencia de verdaderas diferenciaciones ducto glandulares y por mucina intracelular.

3.3 Carcinoma papilar de células escamosas

El carcinoma papilar de células escamosas (CPCE) es una variante del CAEC caracterizado por un desarrollo exofítico, papilomatoso, y tiene un pronóstico favorable. El CPCE se presenta predominantemente en hombres entre la sexta y séptima década. El abuso de tabaco y alcohol son considerados factores etiológicos, algunos tipos de VPH se sugiere pueden ser causa de CPCE, se reporta una prevalencia de VPH que varia de un 0 a un 48% pero el rol de estos virus en la carcinogénesis no esta completamente claro.

La ronquera y la obstrucción de las vías aéreas son los síntomas que más frecuentemente se presentan, otros síntomas incluyen disfagia, tos, irritación de la garganta y hemoptisis.

En cuanto a las características macroscópicas tenemos que el CPCE se presenta como una lesión tumoral suave. Friable, de aspecto polipoide, exofítico y papilar. Frecuentemente se presenta pediculado pero también se describen lesiones con base sésil.

En relación a la capacidad de producir metástasis, este carcinoma puede producirlas en nódulos linfáticos regionales pero rara vez a distancia.

Se han descrito metástasis pulmonares en pacientes con CPCE laríngeo. (Ferlito y col;1994)

Histopatológicamente el tumor se caracteriza por un predominante patrón de desarrollo papilar. Estas papilas presentan un núcleo fibrovascular cubierto por células Basaloides neoplásicas inmaduras por células mas pleomórficas; por lo general con mínimas queratosis. Los focos de necrosis y hemorragia son frecuentes.

La invasión estromal consiste en únicos o multiples nidos de células tumorales con denso infiltrado inflamatorio linfocítico en la interfase tumor-estroma. Si no se observa invasión del estroma, la lesión podría clasificarse como hiperplasia papilar atípica o CPCE in situ.

Los diagnósticos diferenciales del CPCE incluyen papiloma escamoso y CA verrugoso por lo similar de sus arquitecturas, el CPCE se reconoce fácilmente por la atipia del epitelio escamoso. (Ferlito y col; 1999)

Según Batsalis y Suárez (2000) la distinción entre carcinoma de células escamosas papilar y exofítico puede ser complicada ya que los criterios de diagnostico del Ca exofítico no están claramente delimitados.

En general las proyecciones papilares del CPCE son mucho mas definidas que las del CCE exofítico. Suárez y col; (2000) sugieren que el

CPCE puede evolucionar de hiperplasias mucosas papilares o papilomas de células escamosas preexistentes.

3.4 Carcinoma de células fusiformes (CCF)

Esta inusual variante es mas común en laringe que en cavidad bucal u orifaringe.

El carcinoma de células fusiformes (CCF) es un tumor bifásico compuesto por células escamosas bien sea *in situ* y/o invasivas, y un componente de células fusiformes malignas con apariencia mesenquimal, pero de origen epitelial; según lo describe Neville (2002)

En su estudio; Lewis, Olsen y Sebo (2000), plantean que el CCF se presenta predominantemente en hombres en la séptima década de vida, y asocian su etiología con el consumo de tabaco y alcohol así como a la exposición a la radiación. Consideran la laringe como localización mas común en cabeza y cuello.

En relación a los síntomas usualmente se describe ronquera, disfagia y obstrucción de la vía aérea.

Macroscopicamente se observa una lesión de apariencia papiloide de tamaño variable. La superficie se presenta frecuentemente ulcerada.

En relación a las metástasis de CCF a nódulos linfáticos regionales ocurre en un 25% de los casos, pero la diseminación a distancia es menos común. (Thompson, Wineke, Miettinen, Heffner, 2002)

Histopatologicamente el componente fusiforme usualmente conforma la mayor parte del tumor, por lo que puede presentar varios patrones. Los patrones más comunes son los que recuerdan al fibrosarcoma o al histiocitoma fibroso maligno. En algunos casos el patrón puede parecer menos maligno y recordar al de una proliferación fibroblástica reactiva o una atipia del estroma inducida por radiación. Focos de diferenciación osteosarcomatoide, condrosarcomatoide o rabdosarcomatoide pueden evidenciarse en particular en pacientes con radioterapia.

La evidencia de derivaciones de epitelio escamoso pueden ser observadas tanto como carcinoma *in situ* como carcinoma de células escamosas invasivo.

3.5 Carcinoma Acanolítico de células escamosas (CACE)

La Organización Mundial de la Salud (2005) lo define como una variante rara del CAEC, caracterizada por la acantolisis de las células tumorales creando una pseudos luz y una falsa apariencia de diferenciación granular.

No se conoce ningún factor etiológico relacionado con la acantolisis mucosa del CACE. (Brito y col; 2000)

El labio es la localización bucal mas común, no se describen signos clínicos característicos. Histopatológicamente la OMS refiere que esta neoplasia esta compuesta por carcinoma de de células escamosas, pero con focos de acantolisis en los nidos de tumor, creando una aparente diferenciación glandular.

La pseudo luz usualmente contiene células acantólicas y células disqueratóicas, o restos celulares, pero también puede estar vacía. Estas son mas comunes en las áreas profundas del tumor. El componente predominante es el CCE y usualmente es moderadamente diferenciado. El estroma es usualmente desmoplásico y con respuesta inflamatoria.

Muchas veces el CACE debe diferenciarse del carcinoma adenoescamoso, del carcinoma edenoideoquistico y del carcinoma mucoepidermoide. Esto se logra por la demostración de cordones de verdadera formación de glándulas; ausencia de células mioepiteliales y ausencia de mucina. Los marcadores vasculares pueden ser utilizados para distinguirlo del angiosarcoma.

3.6 Carcinoma adenoescamoso (CAAE)

Esta rara y agresiva neoplasia se origina de epitelio superficial y se caracteriza por presentar tanto Ca de células escamosas así como verdadero adenocarcinoma. El sexo masculino presenta predisposición con tendencia a desarrollarse entre la sexta y séptima década de vida.

En la cavidad bucal, esta variante es un CCE con áreas de adenocarcinoma, frecuentemente se identifica como un componente de un gran CCE.

El habito tabáquico y el consumo de alcohol se relaciona con su etiología según la OMS (2005) el sitio mas frecuente es la laringe.

Entre las características clínicas el paciente presenta ronquera, disfagia y/o hemoptisis.

Microscópicamente puede presentarse como una masa exofítica o polipoide, o como una induración mucosa, frecuentemente ulcerada.

Histopatológicamente presenta características tanto de verdadero adenocarcinoma como de CCE. Los dos componentes se presentan muy cercanos pero nunca mezclados como en el carcinoma mucoepidermoide. El componente CCE puede presentarse tanto *in situ* como invasivo. El

componente adenocarcinoma tiende a aparecer en las profundidades del tumor. Este consiste en estructuras tubulares que pueden derivar en “glándulas dentro de glándulas”.

La producción de mucina es típica, tanto intraluminal como intracelular. Sin embargo la mucina no es un requerimiento para el diagnóstico entre la presencia de verdaderas formaciones glandulo-ductales. Las metástasis usualmente presentan ambos componentes, con el predominio de alguno.

Los diagnósticos diferenciales incluyen Ca mucoepidermoide, carcinoma acantolítico de células escamosas, y sialometaplasia necrotizante. El diagnóstico diferencial más importante es con Ca mucoepidermoide, por presentar ambos pobre pronóstico.

| Tabla 4 Diagnósticos diferenciales entre Carcinoma adenoescamoso y Carcinoma Mucoepidermoide en cabeza y cuello | |
|--|--|
| Carcinoma Adenoescamoso | Carcinoma Mucoepidermoide |
| Componente escamoso in situ | No hay Componente escamoso in situ |
| Se origina del epitelio escamoso | Se origina en los ductos seromucosos |
| Perlas de queratina | Pocas perlas de queratina |
| Componente adenoideo en las profundidades | Componente adenoideo muy entremezclado |
| Disposición no lobular | Disposición lobular |
| No células intermedias | Células intermedias grandes y claras. |

FUENTE: Barnes L. y col; 2005

3.7 Carcinoma Caniculatum (epitelioma caniculatum)

Esta rara variante de carcinoma bucal presenta similitudes con lesiones más comúnmente descritas en miembros inferiores con infiltración tumoral en la profundidad del hueso. Los tumores pueden mostrar proliferación del epitelio escamoso estratificado en procesos amplios con núcleos de queratina y criptas llenas de queratina socavadas en el hueso, pero con características obvias de malignidad.

El diagnóstico por biopsia puede ser difícil y es necesaria la correlación con la clínica y los estudios radiográficos.

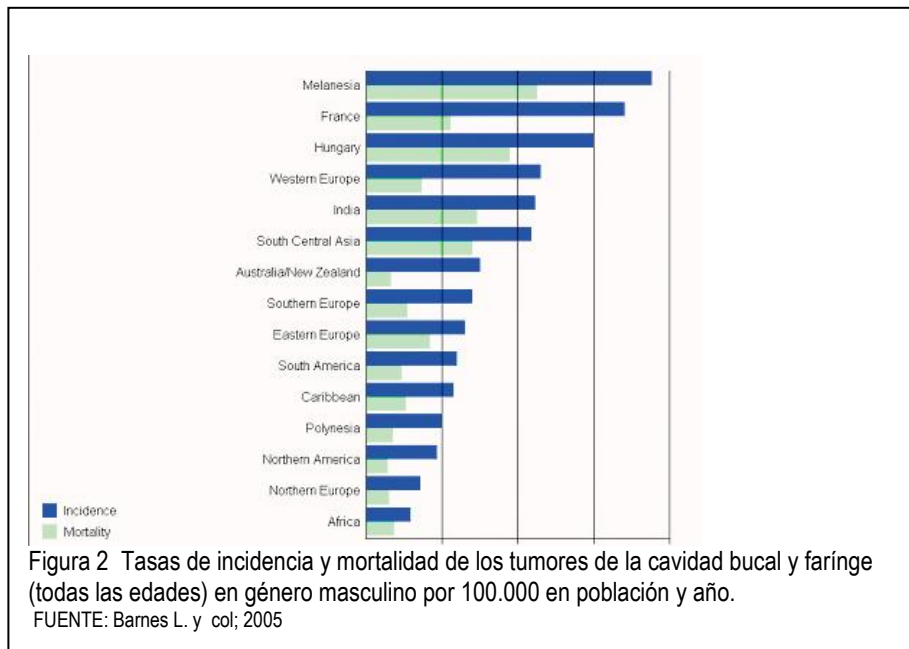
4. Epidemiología

El carcinoma espinocelular es la principal neoplasia de células queratinizantes de la epidermis y el tumor más frecuente de semimucosas y mucosas bucales y genitales. Ocupa el segundo lugar en incidencia dentro de los tumores malignos de piel y mucosas, después del Carcinoma de Células Basales, con una relación 1:4; aunque en algunos países esta relación se aproxima a 1:2 (Sociedad Argentina de Dermatología 2005)

El carcinoma de cabeza y cuello representa la quinta neoplasia maligna más común en el mundo entero, pero este término define un grupo

heterogéneo de neoplasias malignas, involucrando diferentes subtipos con factores de riesgo y características patológicas similares. La mayoría de estos carcinomas de cabeza y cuello corresponden a Carcinoma Espinocelulares (CAEC), originarias del epitelio del tracto aero-digestivo superiores como lo son cavidad bucal, laringe y orofaringe. (Termine y col., 2008).

El carcinoma espinocelular de cabeza y cuello (CAECCC) representa una significativa causa de morbilidad y mortalidad, con una incidencia de aproximadamente 540.000 nuevos casos en el mundo y 271.000 muertes para alcanzar una mortalidad del 50% (Varela y col; 2007)



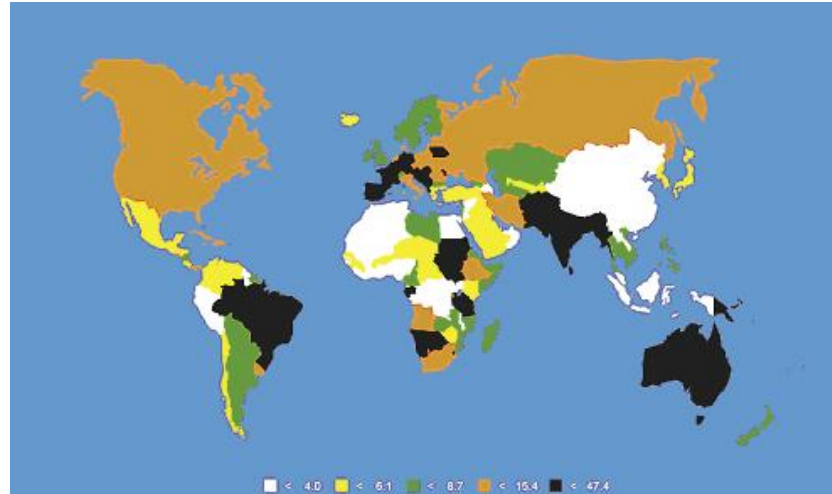
Específicamente el carcinoma espinocelular de la cavidad bucal (CAECCB) ocupa el sexto lugar de frecuencia de lesiones malignas de esta área y la mayor causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Huang y col; 2008) con una incidencia de más 330.000 casos anuales en hombres, y más de 100.00 en mujeres (3% de todos lo casos de cáncer) lo que representa el 8% de todos los casos de cáncer, y con un porcentaje de sobrevida que no ha variado en los últimos años. (Pintos y col; 2008, Franceschi y col; 2000)

Kreimer y Col; (2005) reportan 5.046 casos de CAEC en 60 estudios de 20 países, de los cuales 2.642 conforman Ca de cavidad bucal, 969 Ca de faringe y 1.435 Ca de laringe. Un estimado de 4.350 nuevos casos de CAECCB son diagnosticados anualmente en Canadá, con 1.560 tumores relacionados con muerte para alcanzar una mortalidad de 36%.(Canadian Cancer Society, 2005)

En India y el Sureste de Asia el CAECCB representa el 50% del total de los tumores malignos reportados. (Huang y col; 2008). La OMS en el año 2005 refiere que en hombres, el país con mayor incidencia en el mundo occidental es Francia, y los que presentan elevado aumento de los casos son Suiza, Norte de Italia, Europa del Este y Central y parte de Latinoamérica. Los casos son aun mayores en el Sur de Asia tanto en hombres como en

mujeres. Este tipo de cáncer se presenta más frecuentemente en países en vías al desarrollo y es mas común entre hombre que entre mujeres.

Figura 3 Incidencia global de los tumores de la cavidad bucal y bucofarínge (todas las edades) en género masculino por 100.000 en población y año.



FUENTE: Barnes L. y col ; 2005

5. Bases moleculares del CCE

El carcinoma espinocelular de cabeza y cuello se presenta como una enfermedad multifactorial con anormalidades moleculares complejas. Ésta se produce cuando un número suficiente de alteraciones genéticas afectan de manera irreversible la regulación de la división celular y la apoptosis, lo que trae como resultado un tejido de crecimiento rápido y desordenado (Parkin y col; 2001). Las bases moleculares de la carcinogénesis oral se encuentran

en estudio, los cuales parten de la premisa de que esta patología se desarrolla a partir de una lesión premaligna, que a consecuencia de una expansión clonal de células con alteraciones genéticas acumulativas progresa a una invasión maligna.

Las células basales del epitelio oral presentan normalmente una tasa relativamente alta de actividad mitótica. La aceleración anormal de sus ciclos celulares es uno de los pilares de la carcinogénesis. Las células pueden ser estimuladas con el fin de que se dividan cuando son secretados factores de crecimiento por parte de las células adyacentes o, incluso por la propia célula.

Estos factores pueden originar una alteración en la calidad o cantidad de las proteínas reguladoras del ciclo celular, e inducir de forma ocasional un crecimiento sin control. Los factores de crecimiento se unen a receptores de la superficie celular, lo que induce la actividad de *cinasa* dentro del citoplasma adyacente a la región de unión.

Empleando vías bioquímicas de transducción de señales, los factores de crecimiento progresan con el fin de activar los factores de transcripción. Que se unen a los genes diana para dar lugar a proteínas (*Ciclina*s), que activan el ciclo celular de forma descontrolada, en ocasiones. Los *loci* génicos específicos responsables de producir proteínas que pueden

alterar el ciclo de replicación de las células se denominan *oncogenes* y sus productos proteicos se denominan *oncoproteínas*.

Cuando los *oncogenes* son activados para producir excesos de proteínas que estimulan la mitosis, el resultado es un crecimiento neoplásico. La alteración de la actividad del *oncogen* ha sido asociada con uno o más de los factores ambientales como tabaquismo, alcoholismo, nutrición, entre otros.

Las *ciclinas* activadas y las *quinasas dependientes de ciclinas* (CDC) fosforilan a proteínas como pRB, y liberan el factor de transcripción E2F de su lugar de unión, todo lo cual da como resultado la síntesis de proteínas promotoras de mitosis, que llevan a la célula hacia las fases G1/S y G2/M.

Normalmente el ciclo de replicación celular se encuentra monitorizado y regulado por las proteínas supresoras de tumores (PST), que son capaces de frenar el ciclo celular y conducir a las células hacia la apoptosis. Se sabe que las PST p16, p53 y p21 detienen la progresión anormal del ciclo celular. Los cánceres bucales muestran una alta propensión a tener mutación en los genes supresores, con el consiguiente funcionamiento alterado de las PST y la hiperactivación del ciclo celular.

Según Van Der Riet (1994) la pérdida de la región cromosomal 9p21 se describe en el 70-80% de los casos representando así la alteración genética más común observada en la displasia escamosa y en CAECCC. La pérdida del carácter heterocigoto de 9p21, aparece como un evento temprano en la neoplasia escamosa de cabeza y cuello y puede encontrarse en lesiones preneoplásicas, incluyendo 30% de los casos de hiperplasia escamosa.

La pérdida de la región cromosomal 3p, es otro evento genético temprano en las displasias escamosas y CAECCC invasivo (Rosin y col; 2000).

La mutación de p53 se observa en aproximadamente en el 50% de los casos de CAECCC. Muchas de estas mutaciones parecen ocurrir tardíamente en la progresión de displasia epitelial a carcinoma invasivo (Nawroz y col., 1994). En un estudio que incluyó 102 carcinomas invasivos, 13 displasias severas, y 24 casos de carcinomas escamosas *in situ*, Boyle *et al* (1993) reportó la prevalencia de mutación de p53 en un 43% de los carcinomas invasivos y 19% en las lesiones no invasivas. En un estudio longitudinal de 10 pacientes con biopsias secuenciales en fase de progresión de hiperplasia o displasia moderada a carcinoma *in situ* o carcinoma invasivo, Shahnava *et al* (2000) identificó mutaciones de p53 en 1 de 12 displasias (8%), 2 de 3 en carcinomas *in situ* (66%), y 6 de 8 en carcinomas

invasivos (75%). Cercano al 64% de las mutaciones de p53 en CECCC que ocurren en los nucleótidos Guanina, se desencadenan por exposición a carcinógenos como el tabaco (Boyle *et al*, 1993).

La sobre expresión de *ciclina* D1 se observa en el 30 a 60% de los casos de CAECCC y están asociados al incremento de los nódulos linfáticos metastásicos y al mal pronóstico. *Ciclina* D1 induce la fosforilación de Rb, esto causa el avance de la fase G1 a la fase S. La amplificación y sobre expresión de la *ciclina* D1 es descrita en más del 40% de los casos de displasia oral escamosa, incluyendo displasias moderadas (Meredit y col; 1995).

6. Factores etiológicos

6.1 Tabaco y alcohol

Dos factores de riesgo dominante para el CCE son el uso de tabaco inhalado y el abuso de alcohol, los que presentan fuerte sinergismo. El alcohol y el tabaco son responsables del 75% de las enfermedades malignas que atacan la cavidad bucal y la bucofaringe en Europa, las Américas y Japón. (Negri y col;1993)

Se ha demostrado que no sólo los productos de combustión del tabaco son nocivos para la mucosa, sino también materiales que se extraen

del tabaco cuando se masca o al rape que permite que se descansa sobre el fondo del vestíbulo. (Walshy col., 2000)

Entre los principales componentes del tabaco se encuentran: N-nitrosamina, n-nitroso, nornicita y 4 (metilnitrosamina) 1-(3-piridil)-1 butanona, como uno de los elementos mas importantes en la génesis de los procesos premalignos y malignos de la cavidad bucal. La nicotina afecta la circulación periférica de los tejidos, causando una importante vasoconstricción de las mucosas, por lo cual se disminuye el aporte de los elementos de reparación por la sangre al tejido bucal y por consiguiente se debilita la capacidad de cicatrización, también puede estar suprimido el sistema inmune, esto a causa de una reducción de la quimiotaxis y fagocitosis por parte de los leucocitos. Además la nicotina causa daños a la matriz extracelular de fibroblastos de la mucosa bucal. Una concentración menor de 0,075% causa muerte celular, una de 0,75% causa vacuolación de los fibroblastos por consiguiente aumenta la gravedad de cualquier patología a nivel bucal.

Por otra parte se ha sugerido que ingerir alcohol tiene importancia etiológica por ser irritante de las mucosas por contener etanol el cual inhibe la producción de p53. Por lo tanto su asociación con el tabaco aumenta su condición de factor de riesgo.

El aumento de la incidencia de CAEC en los países occidentales en los años recientes puede atribuirse al aumento en el consumo de alcohol en Europa del norte así como el aumento del consumo de tabaco en partes del sur de Europa. (Macfarlane y col; 1996)

Un incremento importante en el factor de riesgo ha sido reportado entre los pacientes fumadores que no consumen alcohol y en menor grado en aquellos no fumadores pero con marcado hábito alcohólico. (La Vecchia y col; 1999)

El tabaco no inhalado es la mayor causa de CAEC bucal o bucofaringeo en el subcontinente asiático, parte del sureste de Asia; China y Taiwán, al igual que en poblaciones de emigrantes provenientes de estas zonas, especialmente aquellos que consumen betel quid . (Znaor y col; 2003)

El betel o paan quid es un compuesto de sustancias naturales (nueces de areca, hojas de betel, lima y quizás hojas de tabaco) que se mastica por su efecto psicoestimulante. Entre los consumidores de betel en Asia, el riesgo de por vida de desarrollar cáncer bucal es de un importante 8%. Este habito esta muy asociado al desarrollo de lesiones precancerosas tales como leucoplasias (Neville, 2005). La nuez de areca fue declarada como conocido carcinogeno en humanos en 2003 por la International Agency for Research on Cancer (IAEC). En la India cerca del 50% de los cánceres de

cavidad bucal y bucofaringe en hombres y el 90% en mujeres, lo conforman consumidores de betel. (OMS 2003)

Los productos tradicionales del tabaco usados en Sudan y en el Oriente Medio, son pulverizados y fermentados y luego mezclados con bicarbonato de sodio, lo que contiene altos niveles de nitrosaminas y posee un alto nivel carcinogénico. (Idris; Ahmed, Maliki, 1995)

En trabajo publicado por el colegio odontológico español (2007) (Valera y col; 2007) reportan una serie de 218 pacientes de los cuales 97 son casos con carcinoma en cavidad bucal y 121 pacientes control. De los pacientes casos el 83 % afirma ser fumadores y el 74.7% responde positivamente al hábito de consumo de alcohol. 64.9% de estos pacientes afirma el consumo conjunto de dichos tóxicos, existiendo una relación directa entre cáncer oral, el hábito tabáquico y la intensidad del mismo, hasta el punto de poder explicar por sí mismo entre el 83% de todos los cánceres bucales ocurridos en la población de Galicia estudiada , lo que concuerda con el 70 al 81% determinado por Negri *et al* en todos los pacientes diagnosticados con carcinoma bucal en el norte de Italia (Negri y col; 1993); y con el 82% descrito por Garrote y col. (2001) en una población cubana. El resultado de esta investigación resalta que el riesgo de padecer cáncer bucal aumenta 6 veces en pacientes fumadores y se duplica en pacientes con hábito alcohólico.

6.2 Nutrición

Es conocido que los pacientes con deficiencias de hierro especialmente severa como es el caso de los pacientes con síndrome de plumier-vinson o Paterson Kelly; se asocian con un riesgo elevado de CAEC en esófago, bucofaringe y cavidad bucal. Las personas con esta deficiencia tienden a presentar defectos en las células mediadoras de la inmunidad, por otra parte, el hierro es esencial para el funcionamiento normal de las células epiteliales de tracto aerodigestivo superior. En estados de deficiencia, estas células epiteliales degeneran más rápido y producen una mucosa atrófica o inmadura.

Otra deficiencia nutricional con conocido efecto sobre los tejidos es la de la vitamina A. La deficiencia de vitamina A produce una queratización excesiva de la piel y membranas mucosas, así como se ha sugerido que la vitamina juega un rol preventivo para el cáncer bucal. según refiere Neville (2005).

Los Niveles sanguíneos de retinol y la cantidad de betacarotenos ingeridos por la dieta se cree serán inversamente proporcionales al riesgo de presentar CCE o leucoplasias. Las terapias prolongadas con ácido retinoico y betacarotenos pueden asociarse a regresión de algunas leucoplasias o a la reducción del grado de severidad de algunas displasias.

6.3 Infecciones

6.3.1 Bacterianas y Micóticas

Varios agentes infecciosos, como las bacterias (sífilis) y hongos (candidiasis), han sido consideradas factores predisponentes para el desarrollo de CAECCB.

a) Sífilis

Está completamente aceptado la fuerte asociación que existe entre la sífilis terciaria y el desarrollo de cáncer en el dorso de la lengua. Entre las personas que poseen Ca lingual es 5 veces más común determinar una serología positiva por sífilis que entre aquellas personas que no presentan diagnóstico de cáncer.

Los arsénicos y metales pesados utilizados para el tratamiento de la sífilis, antes del advenimiento de los antibióticos poseían propiedades carcinogénicas por si mismas, y probablemente hayan sido los responsables del desarrollo temprano de carcinomas en esta enfermedad. A pesar de la fisiopatología de la sífilis, hoy en día es poco común encontrar asociación entre ésta y el desarrollo de neoplasias malignas bucales, esto debido a que

la infección, por lo general, es diagnosticada y tratada antes de alcanzar la etapa terciaria. (Neville, 2002)

b) Candidiasis

La candidiasis hiperplásica frecuentemente se menciona como una condición oral precancerosa. Experimentalmente algunas cepas de *candida albicans* producen lesiones hiperqueratónicas en el dorso de la lengua sin presentar ningún otro factor que pueda considerarse contribuyente a la formación de neoplasias malignas. En otros estudios se han demostrado que algunas cepas producen nitrosaminas, sustancias químicas que están implicadas en la carcinogénesis; por lo que estas cepas podrían ser potenciales promotoras del cáncer bucal, sin embargo. Hasta la fecha es muy circunstancial la evidencia. (Neville, 2002; Saapp, 2005)

6.3.2 Virales

Los virus oncogénicos pueden jugar un papel importante en una variedad de neoplasias malignas. Los agentes virales capaces de integrarse en el material genético del hospedero quizás sean particularmente peligrosos y potencialmente capaces de comandar la habilidad del hospedero de regular

el desarrollo normal y la proliferación de las células infectadas, de esta forma facilitando el proceso de transformación maligna.

En el pasado, los retrovirus, adenovirus, virus de herpes simple, y el virus papiloma humano, todos ellos eran sospechosos de desempeñar un papel notable en el desarrollo de carcinomas en la cavidad bucal. Sin embargo, aparentemente, es solo el VPH el implicado no solo en carcinoma de la cavidad bucal sino también en carcinoma de laringe, Faringe, esófago, cuello uterino, vulva y pene.(Neville, 2002)

En múltiples estudios realizados en las últimas décadas, se han identificado la presencia de virus como el Epstein Barr y virus de papiloma humano en lesiones neoplásicas, y se ha correlacionado esta asociación como posible etiología de estas patologías

a) VIRUS EPSTEIN-BARR

Es poco el conocimiento reportado en relación a infecciones por virus Epstein-Barr (VEB) en carcinomas epiteliales, esto debido a que no se han diseñado modelos *in vitro* apropiados, y a que la contribución de VEB en el

desarrollo de patologías malignas no está clara; sin embargo en los últimos años son muchos los estudios orientados a esclarecer estas incógnitas.

La data concerniente al papel de VEB en la carcinogénesis CAEC en cavidad bucal es controversial. El DNA viral es encontrado en 0 al 70% de estos carcinomas (Kobayashi y col; 1999).

Virus Epstein-Barr (VEB), fue identificado por primera vez en 1964 por medio de microscópio electrónico en células cultivadas de un Linfoma de Burkitt (Gulley, M 2001). VEB es miembro del grupo de virus de herpes humano (herpesviridae), es un virus de DNA de doble cadena, con genoma recubierto por capsida viral compuesta por glicoproteína GP350 que permite su unión al receptor CP21 de la membrana celular de los Linfocitos B. (Sand y col; 2002) Aproximadamente el 90% de los adultos poseen anticuerpos demostrables para VEB. In vivo. La infección se restringe a dos tipos de células, las buconasofaríngeas o en el epitelio de las glándulas salivales y los linfocitos B. VEB posee la habilidad de producir una infección latente, con períodos de silencio de la infección viral, caracterizada por baja expresión de los genes virales y mínimos efectos citopáticos.

Teniendo como puerta de entrada el epitelio del tracto aerodigestivo superior, este virus es el agente causal de la mononucleosis infecciosa. La infección de las células B se caracteriza por ser una infección latente, volviendo a esta inmortal y permitiendo que replique su genoma viral para constituir nuevos virus.

VEB se asocia a la leucoplasia vellosa bucal; al linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo. VEB se ha aislado tanto en mucosa normal como en CAEC en cavidad bucal.

Más recientemente se han reportado la presencia del genoma viral en tumores similares a linfopiteliomas de otras localizaciones tales como estómago (Oda y col; 2003. Grimstein y col;2002), sistema nervioso central (MacMahon y col; 1991), hígado (Sawara y col;1999) mama (Labrecque y col; 1995. Bonnet y col;.1999), pulmón (Wong y col; 1995. Han y col; 2001. Castro y col; 2001), colon (Samaha y col; 1998.), esófago (Chen y col 2003.) y vías biliares (Jeng y col; 2001). Este diagnóstico molecular se realiza por lo general con reacción de cadena de polimerasa (RCP), hibridación in situ, ó evaluando los bloques de parafina de las biopsias de dichos pacientes con técnicas de inmunohistoquímica.

En estudio realizado en Venezuela por Ponce, Lares, Mattar, Correnti y Avila (2006) de un total de 48 pacientes intervenidos se estudiaron adecuadamente 41 muestras. El promedio de edad de los pacientes era de 55 años, la mayor parte eran del sexo masculino (75,6%) y el 80,5% refería hábitos tabáquicos y alcohólicos.

En cuanto a la localización de las muestras tomadas, 19 (46,3%) eran de laringe, 7 (17%) de nasofaringe, 3 (7,3%) de fosas nasales, 2 (4,8%) de amígdalas, 2 de lengua, 2 de mucosa yugal, 2 de paladar y 2 de senos piriformes. Por último se tomó 1 muestra de antro maxilar y otra de mandíbula (2,4%).

La gran mayoría de las muestras correspondían, en el estudio anatomopatológico definitivo, a lesiones tumorales malignas (75,6%), sólo 10 de estas eran lesiones benignas. De las lesiones malignas, 24 (77,4%) correspondían a carcinomas escamosos y el resto (22,6%) a otras histologías tales como linfopiteliomas (2), carcinoma adenoideo quístico, carcinoma basocelular, carcinoma ameloblástico y un carcinoma papilar de tiroides lingual. Las lesiones benignas eran en su mayoría nódulos laríngeos, acantosis y papilomatosis de la mucosa faríngea y 2 hiperplasias de tejido linfoide en amígdala y nasofaringe.

En cuanto a la determinación del genoma viral, se encontró que 18 de las 41 muestras (43,9%) eran positivas para VEB y 23 (56,1%) eran negativas. Trece de los tumores malignos resultaron positivos para el genoma del VEB (41,9%), mientras que el 48,1% restante (18 muestras) resultaron negativas. La mitad de las lesiones benignas tuvieron presente el ADN del VEB y la otra mitad fue negativa para esta determinación .

b) Virus Papiloma Humano

Virus de Papiloma Humano ha sido implicado en una variedad de enfermedades del área anogenital y aerodigestiva, que van desde verrugas comunes, pasando por papilomas laringeos hasta carcinoma cervical. La primera vez que se aislaron partículas de este virus, fue en 1933 en la papilomatosis de un conejo (Ha y Califano, 2004)

Los virus de papiloma humano o papilomavirus forman parte de la familia de los papovirus. Son virus que poseen una sola molécula de DNA de doble cadena protegida por una cápside, que contiene proteínas de superficie facilitando la fijación del virus a células susceptibles. El virus de papiloma humano mide aproximadamente 50nm de diámetro.

La vía de transmisión del virus es diversa: puede ocurrir por vía perinatal, por infección transplacentaria, por líquido amniótico, por contacto sexual, por autoinoculación y algunos autores sugieren transmisión por saliva. Suele adquirirse en etapas tempranas de la vida.

El virus de papiloma humano se caracteriza por ser epiteliotrópico, es decir, tiene afinidad por los tejidos epiteliales como lo son todas las zonas recubiertas por piel y mucosas o por ambas, como la boca, faringe, lengua, amígdalas, vagina, pene y ano. La transmisión del virus ocurre cuando entra en contacto con dichas regiones permitiendo la transferencia entre células epiteliales (Correnti y col; 2004). El VPH conforma un grupo grande de virus de los cuales se han identificado más de 100 tipos, de estos cerca de 40 son de transmisión sexual y afectan principalmente a las células epiteliales de la piel y la mucosa, y generalmente lo hacen en las capas basales.

Este gran número de tipos virales se dividen en dos grandes grupos según el riesgo que presentan de producir cáncer: de alto riesgo y de bajo riesgo oncogénico.

El VPH de bajo riesgo es aquel cuyo riesgo de producir cáncer es mínimo y son el VPH 6,11,40,42,53,54 y 57. Los VPH que provocan papilomas laríngeos están en este grupo. Los VPH de alto riesgo son los que se encuentran con mayor frecuencia asociados a los casos de cáncer e incluyen el VPH 16, 18, 31, 35, 39,45, 51, 52, 56 y 58, de este grupo el VPH 16 y 18 son los más importantes (Liuzzi y col; 2007). De estos tipos de VPH en la cavidad bucal se han identificado el 1,2,3,4,6,7,10,11,13,16,18,31,32,33,35 y 57. El 13 y el 32 son exclusivos de la cavidad bucal. La mayoría de esos virus son de bajo riesgo oncogénico asociados a lesiones papilomatosas benignas: el 6 y 11 están asociados a papiloma bucal; 6 y 4 a verruga vulgar, 11 al condiloma acuminado; 13 y 32 a la hiperplasia epitelial focal, y tienen bajo potencial de progresión maligna. En contraste, los genotipos de alto riesgo oncogénicos como el 16,18, 31, 33 y 35, están asociados con leucoplasia y carcinoma espino celular.(Correnti y col; 2004)

Los papilomavirus pueden presentar diferentes tropismos, es decir, preferencias por tipos de epitelio determinados, o por una zona concreta de la piel. Así algunos papilomas afectan la mucosa oral, otros la mucosa laríngea, otros los genitales externos y otros la mucosa cervical. (Ha y Califano, 2004).

El genoma típico del VPH consiste en ocho genes que se clasifican en temprano (E) o tardíos (L) según el momento de su expresión en el ciclo vital. Los genes tempranos o precoces intervienen en la regulación de la transcripción, mientras que los genes tardíos codifican las proteínas del cápside viral usadas en la producción de nuevos virus. (Ha y Califano, 2004)

Los genes E1 y E2 intervienen específicamente en el control de la transcripción y replicación del genoma, el gen E4 se ignora su función pero se cree que fomenta la fase reproductiva del ciclo vital del virus papiloma. Los genes E6 y E7 obstaculizan el control de la transcripción y ciclo celular de la célula huésped. Los genes tardíos L1 y L2 codifican las proteínas de capsido viral. (Correnti y col; 2004)

En cuanto a la detección de VPH en mucosa bucal normal, sugiere que no todas las infecciones por el virus necesariamente llevaran a una carcinogénesis, y la importancia de identificar los factores que poseen la habilidad de inducir transformación maligna.

7. VPH Y Cáncer bucal

Walboomers y col; (1999) refiere que el mecanismo de carcinogénesis de VPH fue identificado por primera vez en cáncer cervical. Alrededor del mundo un 90% de los cánceres cervicales están relacionados con infecciones por VPH, y son los tipos 16 y 18 los implicados en la mayoría de los casos.

Recientemente, varios estudios han sido consistentes en la identificación de diferentes tipos de carcinomas en la cavidad oral los cuales parecieran presentar una relación etiológica con la infección por VPH (Pintos y col., 2008)

En el plano celular la cavidad bucal posee una estructura muy semejante a la de la vagina y el cuello uterino; dichos órganos tienen las mismas células epiteliales, que son el blanco de VPH 16 y 18. La mayor parte de los cánceres bucales son provenientes de células epiteliales, sobre todo carcinomas de células escamosas.

Desde la óptica molecular dos genes regulan la división celular normal Rb y p53: Rb produce los factores de transcripción necesarios para el avance a través del ciclo celular. Esto denota que Rb impide que la célula se divida hasta que haya sintetizado suficientes proteínas para la división celular. E2F es la proteína que produce Rb, lo que convierte a Rb en un gen/proteína supresor de tumores que impide continúe el ciclo celular hasta que hayan acumulado suficientes proteínas, en especial E2F. Cuando el VPH infecta a una célula, el gen E7 se fija a Rb de tal modo que Rb transcribe E2F y las otras proteínas. Ésta es una señal para que el ciclo celular avance. En tanto E7 permanezca fijo a Rb, el ciclo celular continuará, causando un ciclo de reproducción celular incontrolada, característica que define a la célula maligna (Correnti y col; 2004, Parkin y col; 2001, Liuzzi y col; 2007)

P53 es el otro gen que VPH ataca. En una célula, p53 actúa en respuesta al DNA dañado. Cuando se deteriora el DNA de una célula, p53 detiene la división celular y dirige a los genes comprometidos en la reparación de ADN a fin de corregir el daño. Si no es posible reparar el DNA, p53 causa entonces la apoptosis, garantizando así que la célula dañada muera y no se divida. En las células cancerosas, la proteína p53 aparece deteriorada o no funcional. Esto favorece que las células con DNA alterado sigan viviendo en lugar de ser destruidas. La proteína viral E6 puede fijarse a

la proteína p53 e inactivarlo. Lo anterior permite que el virus tome la maquinaria de la célula y se reproduzca, dado que el gen p53 inhibido por el virus no puede detenerlo o comenzar el proceso de muerte celular. La división repetida de células con la información del DNA alterada es el inicio de la formación de un tumor maligno. Además de bloquear al gen p53 celular, la proteína viral E6 activa la telomerasa, enzima que sintetiza las secuencias repetitivas del telómero. La activación de esta enzima conserva el ciclo celular repetido que continúa produciendo células infectadas con el virus. Esto deriva en cáncer a medida que las células mutantes siguen reproduciéndose sin control.

La correlación entre el CAECCC y VPH sigue siendo motivo de estudio. En el año 2005 Kreimer, Clifford, Boyle y Franceschi, en su estudio, tienen como objetivo determinar la prevalencia mundial, por tipo y distribución de VPH en tumores de CCECC. En este presentan un total de 5.046 casos de CCE distribuidos en 60 estudios de 26 países, del total de casos 2.646 corresponden a CCE de cavidad bucal, 969 a CCE en bucofaringe y 1.435 a CCE laríngeo. Del total de biopsias un 26% resulto positiva para VPH (bucofaringe 35,9%, bucal 23,5%, laringe 24%). Del total de CCE bucofaringeos con resultado positivo a VPH 86,7% corresponde al tipo 16, en los CCE bucales el 68,2% muestra el tipo 16, y del total de CCE de laringe positivo a VPH en 69,2% se identifica también el tipo 16. Otro

resultado que arroja esta investigación es que el tipo de VPH mas comúnmente identificado es el 16 seguido del 18.

En Venezuela Liuzzi, Estanga, Castillo, Correnti, Mijares y Gardie (2007) publican los resultados de su estudio de tipificación del virus papiloma humano en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, donde de un total de 29 pacientes 12 (41,38%) presentan el carcinoma en cavidad bucal, de los cuales 7 (58.33%) son positivos a VPH; 10 (34,4%) presentan el tumor en laringe y resultan VPH positivo 3 casos (30%). Finalmente de 6 tumores en bucofaringe ninguno presenta infección por VPH.

En estudio realizado en Montreal, Canadá (Pintosy col.) y publicado en el 2008, los investigadores presentan un total de 72 casos de CAEC de los que 14 (19,4%) se diagnostican con infección por VPH; igualmente de 129 controles se identifica VPH en 6 casos (4,7%). En este estudio se identifican con tipos de VPH de alto riesgo oncogénico 13 de los 14 casos positivos y 1 con tipos de bajo riesgo oncogénico.

En un meta-análisis publicado por Termine y col; (2008) de un total de 62 estudios analizados, 15 sin especificación de la localización del CAEC y 47 de CAECCB, suman un total de 4.852 casos, y los resultados se presentan en los siguientes cuadros.

Tabla 5 Resultados de varios estudios de detección de VPH en biopsias en parafina de CAECCC en sitios no específicos, utilizando PRC e Hibridación in situ.

| Año | Autores | No. De casos | País | Método | N | % | CAECCC sitio no especificado | | |
|------|------------------------|--------------|----------------|--------|---|---|------------------------------|------|--------|
| | | | | | | | VPH + | Tipo | |
| 1991 | Watts et al. [34] | 49 | USA | ISH | | | 29 | 60 | 16, 18 |
| 1995 | Fouret et al. [40] | 131 | France | PCR | | | 15 | 11.4 | 16 |
| 1997 | Fouret et al. [41] | 187 | France | PCR | | | 19 | 10.7 | n.d. |
| 1997 | Portugal et al. [42] | 100 | USA | PCR | | | 11 | 11 | n.d. |
| 1999 | Pintos et al. [43] | 101 | Canada | PCR | | | 17 | 16.8 | n.d. |
| 2001 | Lindel et al. [44] | 99 | Germany | PCR | | | 14 | 14.1 | 16 |
| 2001 | Mork et al. [45] | 160 | Norway | PCR | | | 15 | 9 | 16 |
| 2002 | Ha et al [46] | 50 | USA | PCR | | | 1 | 2.1 | 16 |
| 2003 | Dahlstrom et al. [47] | 27 | USA | PCR | | | 8 | 29.6 | 16 |
| 2004 | Paradiso et al. [48] | 57 | Italy | PCR | | | 5 | 8.8 | n.d. |
| 2004 | Yang et al. [49] | 37 | Taiwan | PCR | | | 4 | 10.8 | 16, 18 |
| 2005 | Tachezy et al. [50] | 68 | Czech Republic | PCR | | | 35 | 51.5 | 16, 33 |
| 2006 | Hammastedt et al. [51] | 203 | Sweden | PCR | | | 99 | 48.8 | 16 |

CAECCC,carcinoma espinocelular en cabeza y cuello.VPH virus papiloma humano.ISH hibridación in situ. n.d no detectado

FUENTE: Termine y col; 2008

Tabla 6 Resultados de varios estudios de detección de VPH en biopsias en parafina de CAECB en cavidad bucal, utilizando PRC e Hibridación in situ.

| CAECB | | | | | | VPH + | Tipo |
|-------|--------------------------------|--------------|-----------------|----------|-------|-----------|---------------------------|
| Año | Autores | No. De casos | País | Método | N | % | |
| 1988 | Syrjanen et al. [52] | 51 | Finland | ISH | 6 | 11.8 | 16, 18 |
| 1990 | Chang et al. [53] | 40 | Finland | ISH; PCR | 1; 11 | 2.5; 27.5 | 16 |
| 1990 | Greer et al. [54] | 100 | USA | ISH | 6 | 6 | n.d. |
| 1991 | Young and Min [55] | 27 | USA | PCR | 0 | 0 | 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 |
| 1991 | Zeuss et al.[56] | 15 | Spain | ISH | 0 | 0 | 6, 11 |
| 1993 | Holladay and Gerald [57] | 39 | USA | PCR | 7 | 17.9 | 16 |
| 1994 | Brandwein et al. [58] | 64 | USA | PCR | 16 | 25 | 16 |
| 1994 | Gonzalez-Moles et al. [59] | 27 | Spain | ISH | 10 | 37 | 6, 11 |
| 1995 | Shindoh et al. [60] | 77 | Japan | PCR | 24 | 31.2 | 16 |
| 1995 | Van Rensburg et al. [61] | 66 | South Africa | ISH | 1 | 1.5 | 18 |
| 1996 | Cruz et al. [62] | 35 | The Netherlands | PCR | 19 | 54.3 | 16 |
| 1996 | Mao et al. [63] | 64 | USA | PCR | 20 | 31 | n.d. |
| 1996 | Van Rensburg et al. [64] | 146 | South Africa | PCR | 2 | 1.4 | 11, 16 |
| 1997 | Wen et al. [65] | 45 | Japan | PCR | 14 | 31.1 | 16, 18 |
| 1998 | Ibrahim et al. [66] | 88 | Sudan | ISH; PCR | 0; 0 | 0; 0 | n.d. |
| 1998 | Koh et al. [67] | 42 | Korea | PCR | 22 | 52 | n.d. |
| 1998 | Premoli-De-Percoco et al. [68] | 50 | Venezuela | ISH | 35 | 70 | 16, 18 |
| 1998 | Schwartz et al. [69] | 193 | USA | PCR | 41 | 21.2 | 16 |
| 1999 | Aggelopoulou et al. [70] | 81 | Greece | PCR | 40 | 49 | n.d. |
| 1999 | Pillai et al. [71] | 61 | India | PCR | 17 | 16.8 | 16 |
| 2000 | Badaracco et al. [72] | 66 | Italy | PCR | 24 | 36.4 | 16, 6 |
| 2000 | Bouda et al. [73] | 19 | Greece | PCR | 18 | 94.7 | 16, 18, 33 |
| 2000 | Cao et al. [74] | 40 | China | PCR | 29 | 72.5 | 16, 18 |
| 2000 | Patima et al. [75] | 73 | China | PCR | 54 | 74 | 16, 18 |
| 2000 | Sand et al. [76] | 24 | Sweden | PCR | 3 | 12.5 | 16, 18, 6, 11 |
| 2000 | Tsuhako et al. [77] | 83 | Japan | PCR | 48 | 56.9 | n.d. |
| 2001 | Premoli-De-Percoco et al. [78] | 50 | Venezuela | PCR | 30 | 60 | 16, 18 |
| 2001 | Schwartz et al. [79] | 254 | USA | PCR | 62 | 24.4 | 16 |
| 2002 | Chen et al [80] | 29 | Taiwan | PCR | 24 | 82.7 | 16, 18, 6 |
| 2002 | Kojima et al. [81] | 53 | Japan | PCR | 35 | 66 | 38 |
| 2002 | Nagpal et al. [82] | 110 | India | PCR | 37 | 33.6 | 16, 18 |
| 2003 | Chang et al. [83] | 103 | Japan | PCR | 51 | 49.5 | HR |
| 2003 | Fregonesi et al. [84] | 46 | Brazil | ISH | 18 | 39 | 16, 18, 6, 11 |
| 2003 | Kansky et al. [85] | 62 | Slovenia | PCR | 59 | 95 | 16, 33, 58, 11, 31, 68 |
| 2003 | Kumar et al. [35] | 42 | India | ISH | 13 | 31 | 16 |
| 2003 | Ritchie et al. [86] | 141 | USA | PCR | 21 | 15 | 16, 33 |
| 2003 | Sugiyama et al. [87] | 86 | Japan | PCR | 30 | 34.8 | 16 |
| 2004 | Correnti et al. [88] | 16 | Venezuela | PCR | 8 | 50 | HR |
| 2004 | Dahlgren et al. [89] | 110 | Sweden | PCR | 12 | 10.9 | 16 |
| 2004 | Smith et al. [90] | 106 | USA | PCR | 10 | 9.4 | 16, 33 |
| 2004 | Zhang et al. [91] | 73 | Japan | PCR | 54 | 74 | 16, 18 |
| 2006 | Boy et al. [29] | 59 | South Africa | PCR; ISH | 7; 0 | 11.9; 0 | 18 |
| 2006 | El-Mofty et al. [92] | 94 | USA | PCR | 32 | 30 | 16, 31, 33 |
| 2006 | Nemes et al. [93] | 79 | Hungary | PCR | 33 | 41.7 | 16 |
| 2006 | Rivero et al. [94] | 23 | Brazil | PCR | 0 | 0 | n.d. |
| 2007 | Koyama et al. [95] | 20 | Japan | PCR | 20 | 100 | 18, 22, 16, 70 |
| 2007 | Sugiyama et al. [96] | 66 | Japan | PCR | 66 | 100 | 16 |

CAECCB, carcinoma de células escamosas en cavidad bucal.VPH virus papiloma humano.ISH hibridación in situ. n.d no detectado

FUENTE: Termine y col; 2008

Tabla 7 Métodos de estudio y prevalencia por tipo de VPH en CAECCB según localización geográfica y estudio.

| First author (Cont'd) | Journal abbreviation | year | Country | Source | PCR primers used | No. cases | Any | 6 | 11 | 16 | 18 | 31 | 33 | 35 | 45 | 56 |
|--|---|------|------------------------------|------------------------|----------------------------|--------------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Smith EM [†] | Int J Cancer | 2004 | United States | PE | MY09/11 | 106 | 9.4 | 0.0 | 0.0 | 6.6 | 0.0 | 0.0 | 2.8 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Gillison ML [†] | J Natl Cancer Inst | 2000 | United States | FF [*] | PGMY09/11 | 81 | 12.3 | 0.0 | 0.0 | 12.3 | 1.2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Herrero R [†] | J Natl Cancer Inst | 2003 | Canada | FF [*] | GP5+/6+ | 28 | 10.7 | 0.0 | 0.0 | 10.7 | 7.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Asia | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Balaram P | Int J Cancer | 1995 | India | FF and PE [*] | MY09/11 GP5/6 TS-PCR | 91 | 73.6 | 15.4 | 19.8 | 41.8 | 47.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Shindoh M | Cancer | 1995 | Japan | PE | TS-PCR only | 77 | 31.2 | — | — | 31.2 | 1.3 | — | 0.0 | — | — | — |
| Wen S | Anticancer Res | 1997 | China | PE [*] | TS-PCR only | 45 | 31.1 | — | — | 20.0 | 24.4 | — | — | — | — | — |
| D'Costa J | Oral Oncol | 1998 | India | FF | MY09/11 | 100 | 17.6 | 0.0 | 0.0 | 17.6 | 0.0 | — | 0.0 | — | — | — |
| Mineta H | Anticancer Res | 1998 | Japan | FF | TS-PCR only | 14 | 21.4 | — | — | 21.4 | 0.0 | — | — | — | — | — |
| Tsuhako K | J Oral Pathol Med | 2000 | Japan | PE [*] | TS-PCR only | 83 | 57.8 | 15.7 | 1.2 | 33.7 | 36.1 | — | — | — | — | — |
| Cao J | Chin J Dent Res | 2000 | China | PE | TS-PCR only | 40 | 72.5 | — | — | 52.5 | 27.5 | — | — | — | — | — |
| Shin KH | Int J Oncol | 2002 | Korea | Unsure | TS-PCR only | 76 | 14.5 | — | — | 5.3 | 10.5 | — | 2.6 | — | — | — |
| Nagpal JK | Int J Cancer | 2002 | India | FF and PE | MY09/11 | 110 | 33.6 | — | — | 22.7 | 14.5 | — | — | — | — | — |
| Sugiyama M | Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod | 2003 | Japan | PE [*] | TS-PCR only | 86 | 34.9 | — | — | 34.9 | 2.3 | — | — | — | — | — |
| Higa M [†] | Oral Oncol | 2003 | Japan | FF | TS-PCR only | 46 | 80.4 | 21.7 | 2.2 | 52.2 | 52.2 | — | — | — | — | — |
| Chang JY | Am J Clin Pathol | 2003 | Taiwan | PE [*] | MY09/GP6+ | 103 | 49.5 | 1.0 | 1.0 | 28.2 | 26.2 | 0.0 | 1.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Herrero R [†] | J Natl Cancer Inst | 2003 | India | FF [*] | GP5+/6+ | 262 | 3.1 | 0.0 | 0.0 | 2.7 | 0.8 | 0.0 | 0.0 | 0.4 | 0.0 | 0.0 |
| Other (includes Central and South America, Australia, and Africa) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Premoli-De- Percoco G | J Oral Pathol Med | 2001 | Venezuela | PE | TS-PCR only | 50 | 60.0 | 0.0 | 0.0 | 50.0 | 16.0 | — | — | — | — | — |
| Herrero R [†] | J Natl Cancer Inst | 2003 | Cuba, Australia, Sudan | FF [*] | GP5+/6+ | 13.8 | 2.9 | 0.0 | 0.0 | 2.2 | 1.4 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

Abbreviations: FF, fresh frozen; PE, paraffin embedded; TS, type specific; Exf, exfoliated oral cells.

^{*}Study assessed a human gene marker for the quality of the cancer specimen and reported results for this laboratory assessment.

[†]Author provided additional data from their study for this review.

[‡]Study not included in analysis of biopsy specimens.

FUENTE: Kreimer y col; 2005

Tabla 8 Estudios CAECCC según localización, sitio geográfico del estudio y prevalencia general de VPH.

Table 1. Studies of HNSCCs by cancer site, geographic location of study, and overall prevalence of HPV

| Site | Geographic location | No. studies | No. cases | Overall HPV prevalence (95% CI) |
|---------------------|---|-----------------|-----------|---------------------------------|
| Oral cavity | Australia, Canada, China, Cuba, Finland, France, Germany, India, Ireland, Italy, Japan, Korea, Netherlands, Norway, Poland, Spain, Slovenia, Sudan, Sweden, Switzerland, Taiwan, United Kingdom, United States, Venezuela | 35 | 2,642 | 23.5 (21.9-25.1) |
| Oropharynx | Australia, Canada, Cuba, Finland, France, Germany, India, Ireland, Italy, Japan, Netherlands, Norway, Poland, Spain, Slovenia, Sudan, Sweden, Switzerland, United States | 27 | 969 | 35.6 (32.6-38.7) |
| Larynx [*] | Canada, Cuba, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, India, Italy, Japan, Netherlands, Norway, Spain, Slovenia, Sweden, Switzerland, United Kingdom, United States | 35 | 1,435 | 24.0 (21.8-26.3) |
| Overall | As listed above | 60 [†] | 5,046 | 25.9 (24.7-27.2) |

^{*}Larynx includes cases of the hypopharynx.

[†]Does not sum to total number of studies because some studies investigated multiple sites.

FUENTE: Kreimer y col; 2005

II.- MATERIALES Y METODOS

Para la realización del estudio se requirieron equipos de laboratorio para el diagnóstico molecular, tales como estufas, termociclador, centrifugas, agitadores, etc. Todos ellos ubicados en el laboratorio de genética molecular del Instituto de Oncología y Hematología de la Universidad Central de Venezuela, igualmente se utilizaron reactivos químicos de diferentes casas comerciales según el método elegido para el procesamiento de las muestras; por otra parte el material biológico comprendido por un total de 48 muestras de tejido extraído de tumores de carcinoma de células escamosas ubicadas en cavidad bucal y bucofaringe, y de tejido sano.

1. Metodología

Selección de la muestra

Se evaluaron 48 (n=48) biopsias de pacientes que asistieron al servicio de cabeza y cuello del Instituto de Oncología "Dr. Luis Razetti", y al laboratorio central de histiopatología Dr. Pedro Tinoco de la facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela, en el período comprendido entre 2002 y enero 2009. La selección se realizó según criterios

de inclusión propuestos: Pacientes de cualquier edad y género con diagnóstico confirmado de carcinoma espinocelular de la cavidad bucal y bucofaríngea, que no estuvieran en tratamiento con quimio o radio terapia y que desearan participar en el estudio. La muestra se dividió en 3 grupos. El grupo Carcinoma conformado por 28 (n=28) casos diagnosticados previamente con carcinoma de células escamosas en cavidad bucal y/o bucofaringe. Grupo Displasia conformado por 10 casos (n=10) diagnosticados con displasia moderada y severa, y por último un grupo control de 10 (n=10) biopsias de tejido sano.

Las muestras fueron tomadas por medio de procedimiento quirúrgico de biopsias incisionales en los quirófanos del Instituto de Oncología Dr. Luis Razetti, y los del postgrado de cirugía bucal de la facultad de Odontología de la UCV y conservadas en formol buffer al 10% hasta su inclusión en parafina.

Las muestras correspondientes a los grupos de estudio carcinoma y displasia fueron dobles, una se sometió a estudios histopatológico con inclusión en parafina, los correspondientes cortes y coloración de hematoxilina-eosina para luego hacer el examen al microscopio para verificar el diagnóstico y clasificar cada muestra de acuerdo a sus características histopatológicas según los criterios propuestos por Anneroth

(1987) los cuales incluyen 6 items 1) queratinización, 2) pleomorfismo, 3) número de mitosis por campo, 4) patrón de invasión, 5) estadio de la invasión y 6) infiltrado linfocítico.

Para el grupo de control se tomaron muestras únicas de mucosa de zona retromolar de pacientes sanos que asistieron al postgrado de cirugía bucal, las cuales fueron almacenadas a -70°C hasta el momento de procesarlas.

Procesado de las muestras.

a) Extracción de ADN

Para la extracción y purificación del ADN de las muestras se aplicó el protocolo descrito en el kit de extracción QUIAGEN® de la casa Saixx. Este proceso fue aplicado al total de las muestras congeladas (n=48).

Procedimiento:

1. Se determinó la cantidad de tejido a utilizar (no más de 25 mg.)

1mg de tejido_____0,2 – 1,2 ug de ADN

2. Se cortó el tejido y se colocó en un tubo de 1,5 ml. Se añadió μl de xilol. Se mezcló con vórtex.
3. Se centrifugó durante 5 minutos utilizando centrifuga marca Eppendorf® modelo Centrifuge 5417 R.
4. Se descartó el sobrenadante por pipeteo, sin descartar el sedimento.
5. Se añadió 1200 μl de etanol al 96-100%. Se mezcló con vórtex.
6. Se centrifugó por 5 minutos .
7. Se descartó el sobrenadante por pipeteo, sin descartar el sedimento.
8. Se repitieron los pasos 5, 6 y 7.
9. Se dejó secar el etanol.
10. Se resuspendió el tejido en 180 μl de buffer ATL.
11. Se añadió 20 μl de proteinasa K, se mezcló en vórtex y se incubó a 56°C, hasta que el tejido estuvo completamente lisado. Se mezcló en vórtex ocasionalmente durante la incubación para dispersar la mezcla. (2 a 3 veces por hora. Lisis completa de 1 a 3 horas. (Lisis permitida durante la noche)
12. Se centrifugó brevemente.
13. Se añadió 200 μl de buffer AI, se mezcló en vórtex durante 15 segundos e incubó a 70°C durante 10 minutos y se centrifugó brevemente.

14. Se añadió 200 µl de etanol al 96 – 100% a la muestra y se mezcló en vórtex durante 15 segundos. Se centrifugó brevemente.
15. Cuidadosamente se pasó la muestra (incluyendo el precipitado, si lo hubo), a una columna con tubo colector de 2 ml. Se centrifugó a 6.000g durante 1 minuto. Se descartó el tubo con el filtrado.
16. Se colocó la columna en un tubo colector nuevo y se añadió 500 µl de buffer AW1. Se tapó y centrifugó a 6.000g durante 1 minuto y se descartó el filtrado.
17. Se colocó la columna en un tubo colector nuevo y se añadió 500 µl de buffer AW2. se centrifugó a 20.000g durante 3 minutos.
18. Se descartó el filtrado, se centrifugó a 20.000g durante 1 minuto para eliminar restos de buffer.
19. Se colocó la columna en un tubo de 1,5 ml y se añadió 200 ul de buffer AE o agua destilada. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se centrifugó a 6.000g durante 1 minuto.
20. Se repitió el paso 11.

El ADN extraído se utilizó, tanto para el diagnóstico molecular de VPH como para determinar de presencia de genoma de VEB.

b) Amplificación del ADN de VPH

Reacción en cadena de la Polimerasa (RCP) para VPH

La amplificación del material genético se realizó por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) para lo cual se utilizó el Termocicador marca Eppendorf® modelo 22331. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 50 µl utilizando los oligonucleótidos cebadores consenso MY09/MY11, que permiten amplificar un extenso espectro de tipos de VPH. Los oligonucleótidos se unen a una región altamente conservada del gen L1 que codifica para una proteína de la cápside viral, amplificando un fragmento de 450 pb. 1 µg de ADN se incubó con los siguientes reactivos:

| Reactivos | Cantidad |
|----------------------------|-----------------|
| dNTP's (100 mM) | 0.4 µl |
| Primer MY09 | 0.2 µl |
| Primer MY11 | 0.2 µl |
| Primers β-Globina | 1.2 µl |
| Buffer 10 X | 6.25 µl |
| MgCl ₂ (50 mM) | 4.0 µl |
| Taq. Polimerasa (5U/ µl) | 0.5 µl |
| H ₂ O destilada | 26.05 µl |

Condiciones de Amplificación

1.- Temperatura Inicial de Desnaturalización: 94°C por 4', seguido de 40 ciclos

2.- Temperatura de Desnaturalización: 94°C por 15''

3.- Temperatura de Anillamiento: 55°C por 30''

4.- Temperatura de Extensión: 72°C por 45'' y una

5.- Temperatura de Extensión Final: 72°C por 7'

El producto amplificado se visualizará en un gel de agarosa al 2 % teñido con Bromuro de Etidio.

Interpretación de los Resultados

Una muestra se considerará positiva, cuando se observe en el gel dos bandas, una de 450 pb correspondiente al amplificado del VPH y otra de 268 pb correspondiente a la banda de β - Globina (control interno).

Una muestra se considerará negativa, cuando se observe en el gel una sola banda de 268 pb correspondiente al gen β - Globina.

c) Detección y tipificación del VPH.

Para el proceso de identificación y tipificación de virus papiloma humano se aplicó el ensayo INNO-LiPA HPV genotyping extra de la casa

Innogenetics® el cual es un ensayo con sondas inmovilizadas en tira para diagnóstico *in vitro*, diseñado para la identificación de 28 genotipos distintos del virus de papiloma humano mediante la detección de secuencias específicas de la región L1 del genoma de VPH.

Este ensayo se basa en el principio de hibridación reversa. Se amplifica parte de la región L1 del genoma viral mediante cebadores SPF10. Los amplicones biotinilados resultantes se desnaturalizan y se hibridan con sondas de oligonucleótidos específicas. Se agregan cebadores adicionales para la amplificación del gen humano HLA-DPB1 a fin de controlar la cantidad de la muestra y la extracción. Todas las sondas se inmovilizan como bandas paralelas en tiras de membrana. Después de la hibridación y el lavado astringente, se añade fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina, la cual se unirá cualquier híbrido biotinilado formado previamente.

La incubación con el cromógeno BCIP/NBT produce un precipitado de color morado que permite la interpretación visual de los resultados.

Pasos del ensayo INNO-LiPA

PASO 1 Amplificación del ADN extraído.

PASO 2 Hibridación del producto amplificado en la sonda de la tira de membrana, seguida de un lavado astringente.

PASO 3 Adición de conjugado y sustrato, dando lugar al desarrollo del color.

PASO 4 Interpretación visual del patrón de señales.

Hibridación

Se calentó en baño de agua a 49°C, para precalentar la solución de hibridación y la solución de lavado astringente a una temperatura de 37°C como mínimo y no mayor a 49°C.

1. Utilizando pinzas se retiraron del tubo las tiras de ensayo que sean necesarias (1 tira por muestra) y se escribe con lápiz un número de identificación por encima de la marca roja de las tiras.
2. Se coloca con la bandeja el número de cubetas a utilizar (1 por tira)
3. Se agrega con pipeta 10 μ l de solución de desnaturalización en la esquina superior de cada cubeta.
4. Añadir 10 μ l de producto amplificado biotinilado a la solución desnaturalizada y mezcle cuidadosamente. Se permite que ocurra la desnaturalización a temperatura ambiente durante 5 minutos.
5. Agitar la solución de hibridación precalentada y se añade 2ml al producto desnaturalizado a cada cubeta

6. Se coloca inmediatamente la tira en la cubeta, debe quedar sumergida.

7. Colocar las bandejas en el baño de agitación de una temperatura de 49°C durante 60 min para lo que utilizará en agitador marca Eppendorf utilizando centrifuga marca Eppendorf® modelo Termomixer Comfort.

Lavado astringente

Luego de la hibridación se retiran las bandejas del baño de agua

1. Aspirar el líquido de la cubeta. Añada 2 ml de solución de lavado astringente a cada cubeta precalentada y lave balanceando la bandeja durante 10-20 segundos a temperatura ambiente. Aspirar la solución de cada cubeta.

2. Repetir una vez este paso de lavado.

3. Por ultimo se aspira la solución y se incuba cada tira en 2 ml de solución de lavado astringente precalentada en el baño de agua a 49°C durante 30 min.

Revelado de color

Todas las incubaciones previas se realizan a 20-25°C en un agitador

1. Lavar cada tira en 2 ml de solución de lavado diluida, durante 1 minuto. Aspirar el líquido.
2. Añadir 2 ml de la solución de conjugado a cada cubeta e incube durante 30 minutos en el agitador.
3. Lavar cada tira dos veces durante 1 minuto con solución de lavado diluida y lavar una vez mas con 2 ml. de tampón® sustrato. Aspirar el líquido.
4. Añada 2 ml. de sustrato a cada cubeta e incubar durante 30 min en agitador. Aspirar el líquido.
5. Detener el revelado con lavado de las tiras dos veces con 2 ml de agua destilada agitando durante 3 min.
6. Con pinzas se retiran las tiras de las cubetas y colocarles en papel absorbente. Esperar que se sequen bien y se fijan a la hoja de registro.

Interpretación de los resultados

Todas las bandas claramente visibles deben clasificarse utilizando la tarjeta de lectura de INNO-LiPA® HPV genotiping extra. Los Patrones de bandas se comparan con el diagrama de interpretación suministrado en el kit.

Se consideran positivos:

- Tiras con bandas de control de conjugado, control ADN humano, y alguno de los dos controles VPH positivos.

- Tiras con bandas de control de conjugado, control ADN humano, y alguno de los dos controles VPH positivos, bandas de tipos de VPH se consideran negativos:
- Tiras con banda de control conjugado, banda ADN humano, sin bandas de ADN VPH.

Se consideran inhibidos:

- Tiras sin banda de control conjugado
- Tiras sin banda de ADN humano
- Tiras sin ninguna banda

d) Amplificación y Detección del VEB.

Para la detección del virus de Epstein-Barr, se empleó el Kit (estuche) Epstein-Barr virus BMLF1 de Maxim Biotech, Inc. (secuencia de anillamiento en base de datos M80517 secuencia de primers:

5´oligo CTT GGA GAC AGG CTT AAC CAG ACT CA

3´oligo CCA TGG CTG CAC CGA TGA AAG TTA T

Mezcla de reacción para la detección de VEB mediante RCP

| REACTIVOS | CANTIDAD |
|------------------------|-----------------|
| BUFFER | 25 µl |
| Primers 10X | 7 µl |
| Taq. DNA Polimerasa | 0,4 µl |
| H ₂ O | 4,8 µl |

A cada uno de los tubos de reacción, se le agregaron 10 µl del ADN extraído y posteriormente se colocaron en el termociclador marca Eppendorf® modelo 22331 (Hamburg n 5345)) bajo las siguientes condiciones:

1. Temperatura Inicial de Desnaturalización: 96 °C por 1', seguida de 35 ciclos.
2. Temperatura de Desnaturalización: 94 °C por 1'
3. Temperatura de Anillamiento: 58 °C por 1'
4. Temperatura de Extensión: 72 °C por 1'
5. Temperatura de extensión final: 72 °C por 10'

Visualización de los productos amplificados

La visualización de los productos amplificados, se realizó en un gel de Agarosa al 2%, teñido con Bromuro de Etidio.

1. En cada pozo se cargaron 3 µl de buffer de carga + 12 µl del amplificado.
2. La corrida se realizó a 100 voltios con una fuente de poder marca BioRad® modelo 200.
3. Posteriormente se visualizó el gel en el transiluminador marca Macrovue® LKB modelo 2011.
4. Por último se fotografió el gel para su registro permanente.

Interpretación de los resultados

Una muestra se considera positivo si al ver el gel en el transiluminador se observa una banda de 265 pb, y se considera negativa cuando no es posible ver ninguna banda y los controles de la PCR funcionan perfectamente.

Análisis estadístico

Debido al nivel de las variables tomadas en cuenta en la investigación se aplicaron 3 métodos de análisis estadístico básicos: frecuencias, chi cuadrado, Kruskal Wallis y rho de spearman, esto debido al hecho de que el estudio posee variables nominales y ordinales en 3 grupos independientes. El software utilizado fue el SPSS 15.0

OBJETIVO GENERAL

Detección y tipificación de Virus Papiloma Humano y Virus Epstein-Barr en Carcinoma espinocelular bucal y bucofaríngeo, en los pacientes del Instituto Oncológico “Dr. Luis Razetti” y Laboratorio Central de Histopatología Dr. Pedro Tinoco de La Facultad de Odontología de La Universidad Central de Venezuela.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer las características epidemiológicas de las lesiones bucales y bucofaríngeas de carcinoma espinocelular en cuanto a edad, género, hábito tabáquico, localización y clínica.
2. Detectar y tipificar el genoma de VPH en lesiones Bucales y bucofaringeas de carcinoma espinocelular.
3. Detectar el genoma de VEB en lesiones Bucales, bucofaríngeas de Carcinoma espinocelular.

4. Establecer la relación entre las características epidemiológicas y la presencia de VPH y/o VEB en lesiones Bucales, bucofaríngeas de Carcinoma espinocelular.
5. Correlacionar la presencia de lesiones y el hábito tabáquico del paciente.

III.- RESULTADOS

El estudio fue realizado en pacientes que acudieron al Servicio de Cabeza y Cuello del Instituto de Oncología Dr. Luis Razetti, el Postgrado de Cirugía Bucal y el Laboratorio General de Histopatología Dr. Pedro Tinoco, de la Facultad de Odontología de Universidad Central de Venezuela.

Para este estudio se evaluaron 48 muestras en total (n= 48), constituidos por 28 casos que presentaban diagnóstico de carcinoma espinocelular, 10 con diagnóstico de displasias entre moderadas y severas, y el grupo control que incluyó 10 individuos sanos.

A continuación se presenta el análisis estadístico descriptivo de toda la población así como por grupo.

1.- Distribución de la muestra total según género

En la muestra estudiada el 39.6% de los sujetos (19/48) fueron del género femenino. Mientras que el 60.4% (29/48) fueron del género masculino. Para el grupo de carcinomas el género predominante fue el masculino alcanzando un 64,3% (18/28) mientras que el femenino acumuló un porcentaje del 35,7% (10/28). En el grupo de displasias, similar al grupo carcinoma, el género masculino fue el que se presentó con mayor

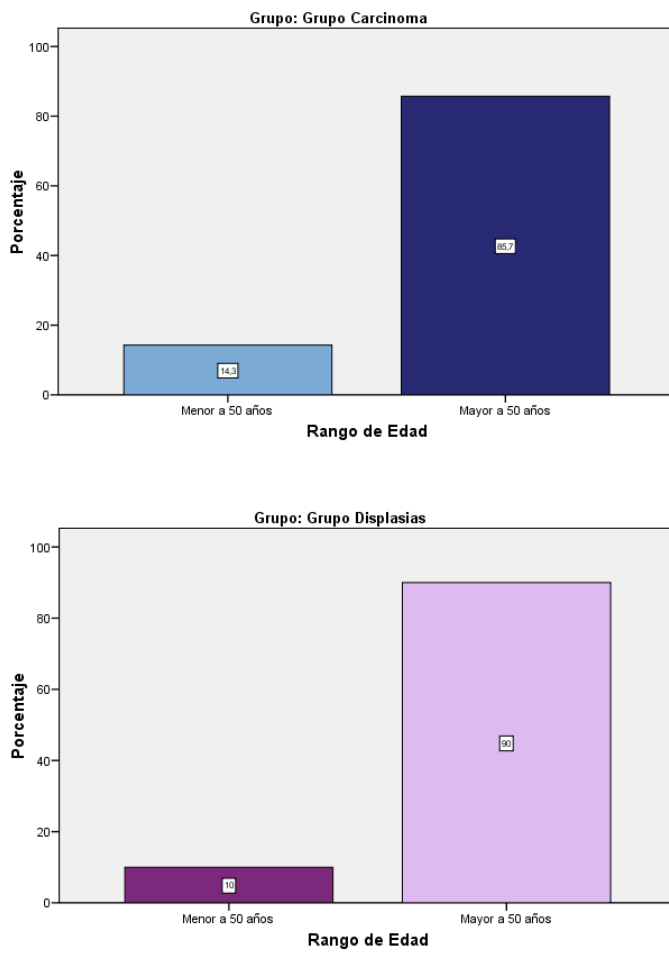
frecuencia representando un 70% (7/10) y el femenino representó un 30% del total (3/10).

2.- Distribución de los pacientes con diagnóstico de carcinoma o displasia según rango de edad

Para el grupo de pacientes con diagnóstico de CAEC la edad mínima fue de 44 años mientras que la máxima fue de 81 con una media 63.2 ± 10.71 en comparación con el grupo de pacientes con diagnóstico de displasia en el que la edad mínima fue de 22 años y la máxima de 61 y una media de 52.8 ± 11.5 años.

En relación a los rangos de edad para el grupo de CCE el 14,3% (4/28) de los individuos se encontraron dentro del rango de menores de 50 años mientras que el rango de mayores de 50 años alcanzó un 85,7 % (24/28). En comparación con el grupo de displasias en que el porcentaje de individuos menores de 50 años fue del 10%(1/10) y el de mayores de 50 años alcanzó un 90% (9/10) como se puede observar en la figura 4. Para ambos grupos las diferencias fueron estadísticamente significativas ($P < 0,05$)

Figura 4 Distribución de los pacientes con diagnóstico de carcinoma o displasia según rango de edad



3. Distribución de los pacientes con diagnóstico de carcinoma o displasia según localización de la lesión.

En relación a la ubicación de las lesiones del grupo de pacientes diagnosticados con CAEC quedaron distribuidas porcentualmente de la siguiente manera: 1/28 lesión (3.6%) se ubicó en dorso de lengua igualmente solo una lesión (3.6%) se localizó en mucosa yugal. 2/28 lesiones (7.1%) se ubicaron en el paladar. 2/28 lesiones (7.1%) se localizaron en piso de boca, al igual que en cara ventral de lengua y labio. Un total de 8/28 lesiones (28.6%) se ubicaron en orofaringe y finalmente un número de 10/28 lesiones (35.7%) se localizaron en reborde alveolar, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) (Tabla 9a)

Como se observa en la tabla 9b, las lesiones displásicas se distribuyeron en la cavidad bucal de la siguiente forma: en zona retromolar y en paladar se ubicó una lesión respectivamente lo que representa un 10% del total en cada caso. 2/10 lesiones (20%) se localizaron en mucosa yugal, igualmente 2/10 lesiones se identificaron en labio y finalmente 3/10 lesiones (30%) del total de los casos se localizaron en reborde alveolar.

Tabla 9a. Distribución de los pacientes con diagnóstico de carcinoma según localización de la lesión.

| Tabla 9a | | Localización Grupo Carcinoma | | | |
|-----------------|------------------------|-------------------------------------|------------|-------------------|----------------------|
| | | Frecuencia | Porcentaje | Porcentaje Válido | Porcentaje Acumulado |
| Válidos | Paladar | 2 | 7,1 | 7,1 | 7,1 |
| | Piso de Boca | 2 | 7,1 | 7,1 | 14,3 |
| | Cara Ventral de Lengua | 2 | 7,1 | 7,1 | 21,4 |
| | Dorso de Lengua | 1 | 3,6 | 3,6 | 25,0 |
| | Labio | 2 | 7,1 | 7,1 | 32,1 |
| | Mucosa Yugal | 1 | 3,6 | 3,6 | 35,7 |
| | Orofaringe | 8 | 28,6 | 28,6 | 64,3 |
| | Reborde Alveolar | 10 | 35,7 | 35,7 | 100,0 |
| | Total | 28 | 100,0 | 100,0 | |

Tabla 9b. Distribución de los pacientes con diagnóstico de displasia según localización de la lesión.

| Tabla 9b | | Localización Grupo Displasia | | | |
|-----------------|------------------|-------------------------------------|------------|-------------------|----------------------|
| | | Frecuencia | Porcentaje | Porcentaje Válido | Porcentaje Acumulado |
| Válidos | Sin Ubicación | 1 | 10,0 | 10,0 | 10,0 |
| | Retromolar | 1 | 10,0 | 10,0 | 20,0 |
| | Paladar | 1 | 10,0 | 10,0 | 30,0 |
| | Mucosa Yugal | 2 | 20,0 | 20,0 | 50,0 |
| | Labio | 2 | 20,0 | 20,0 | 70,0 |
| | Reborde Alveolar | 3 | 30,0 | 30,0 | 100,0 |
| | Total | 10 | 100,0 | 100,0 | |

4. Distribución de los pacientes con diagnóstico de carcinoma o displasia según diagnóstico histopatológico.

Según lo representado en el figura 5a, los pacientes del grupo de carcinomas quedaron distribuidos de la siguiente manera según el diagnóstico histopatológico: 3.6% (1/28) fue diagnosticado como carcinoma verrucoso; (4/28) 14.3% casos se diagnosticaron como carcinoma superficialmente invasivo, y según el grado de diferenciación (4/28) casos 14.3% se designaron con carcinoma espinocelular moderadamente diferenciado; (5/28) 17.9% de los casos se diagnosticaron como carcinoma espinocelular pobremente diferenciado y finalmente (14/28) 50 % de los casos, se diagnosticaron como carcinoma espinocelular bien diferenciado. Las diferencias observadas fueron estadísticamente significativa. ($P < 0,05$)

En relación a los pacientes con displasias se diagnosticaron histopatológicamente según el grado de displasia presentada, de este modo el 70% (7/10) de los casos fueron displasias epiteliales moderadas y el 30% (3/10) fueron displasias epiteliales severas. (Figura 5b)

Figura 5a Distribución de los pacientes con diagnóstico de CAEC o displasia según diagnóstico histopatológico.

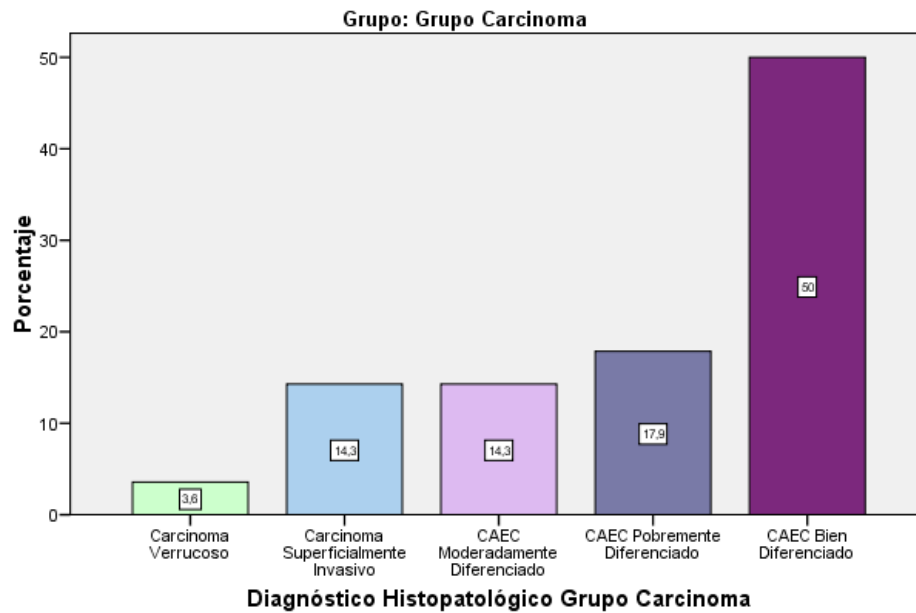
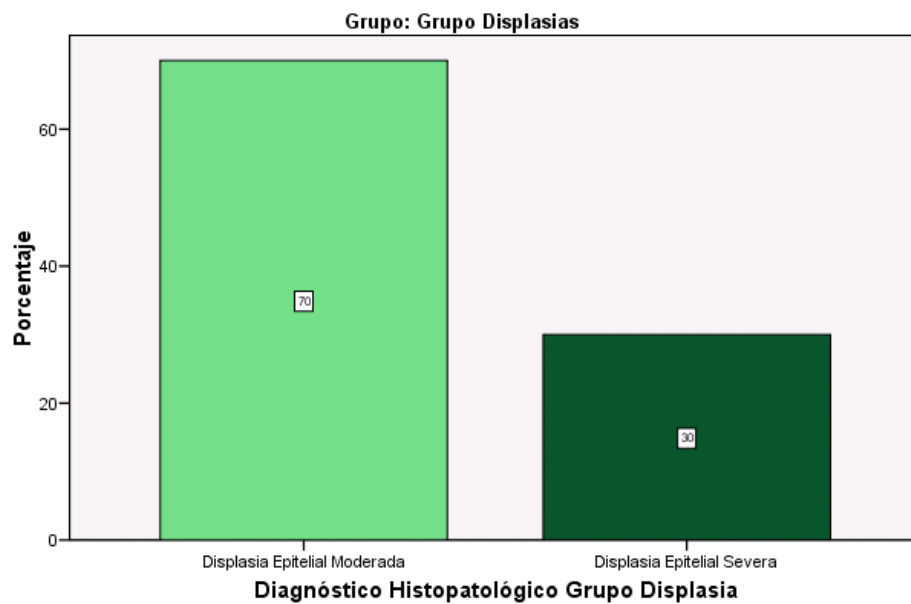


Figura 5b Distribución de los pacientes con displasia según diagnóstico histopatológico



5.- Distribución de los pacientes con CAEC o displasia y grupo control según el hábito tabáquico

En relación al hábito tabáquico, en el grupo de pacientes con diagnóstico de carcinoma se observó un total de 78,6% (22/28) de pacientes fumadores y un 21,4% (6/28) refirieron no ser fumadores. Esta diferencia resulto ser estadísticamente significativa ($P < 0,05$). (Figura 6a). En el grupo de displasias el total de pacientes fumadores alcanzó el 80% (8/10) y un 20% (2/10) negó el hábito. (Figura 6b). Con respecto al grupo control ningún paciente refirió hábito tabáquico.

Figura 6a Distribución de los pacientes con displasia según Hábito tabáquico

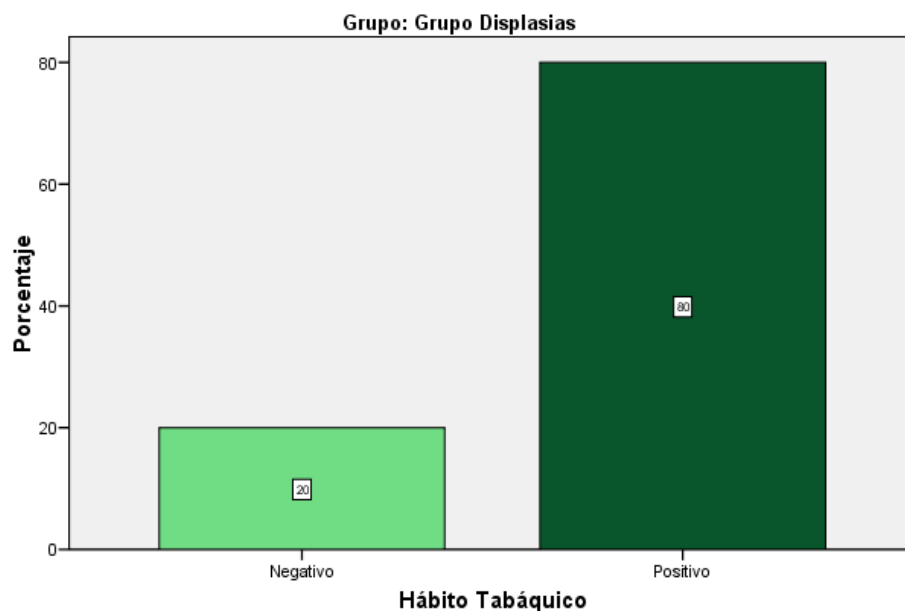
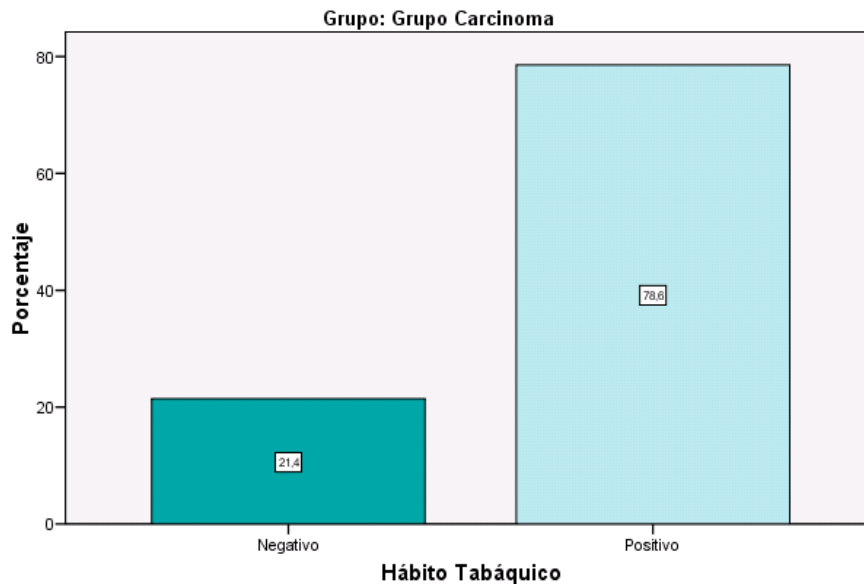


Figura 6b Dsitrubución de los pacientes con CAEC según hábito tabáquico



6.- Relación entre hábito tabáquico y diagnóstico histopatológico en pacientes con carcinoma o displasia.

En las figuras 7a y 7b se puede observar la relación existente entre el hábito tabáquico y el diagnóstico histopatológico de los pacientes de los grupos carcinoma y displasia. Para el primer grupo es de notar que los 4/28 pacientes con diagnóstico de carcinoma superficialmente invasivo afirmaron consumir tabaco inhalado (cigarrillo), del total de los pacientes con diagnóstico de CAEC moderadamente diferenciado la totalidad (4/28) aseguraron consumir tabaco inhalado (cigarrillo); de los 5 casos diagnosticados como CAEC pobremente diferenciado 2 respondieron de

forma negativa al hábito y 3 de forma positiva. Finalmente de los 14 pacientes con diagnóstico de CAEC bien diferenciado 3 no eran fumadores y 11 si lo eran. La relación no fue estadísticamente significativa. (Figura 7a)

Con respecto al grupo de displasias se observó que los pacientes con diagnóstico de displasia epitelial moderada alcanzaron un total de 7, de los cuales 6 resultaron ser fumadores de cigarrillo y solo un paciente negó el hábito tabáquico. En el caso de las displasias epiteliales severas de los 3 pacientes diagnosticados 1 negó el consumo de tabaco mientras que dos lo afirmaron. Esta distribución no es estadísticamente significativa. (figura 7b)

Figura 7a Relación entre hábito tabáquico y diagnóstico histopatológico en pacientes con carcinoma.

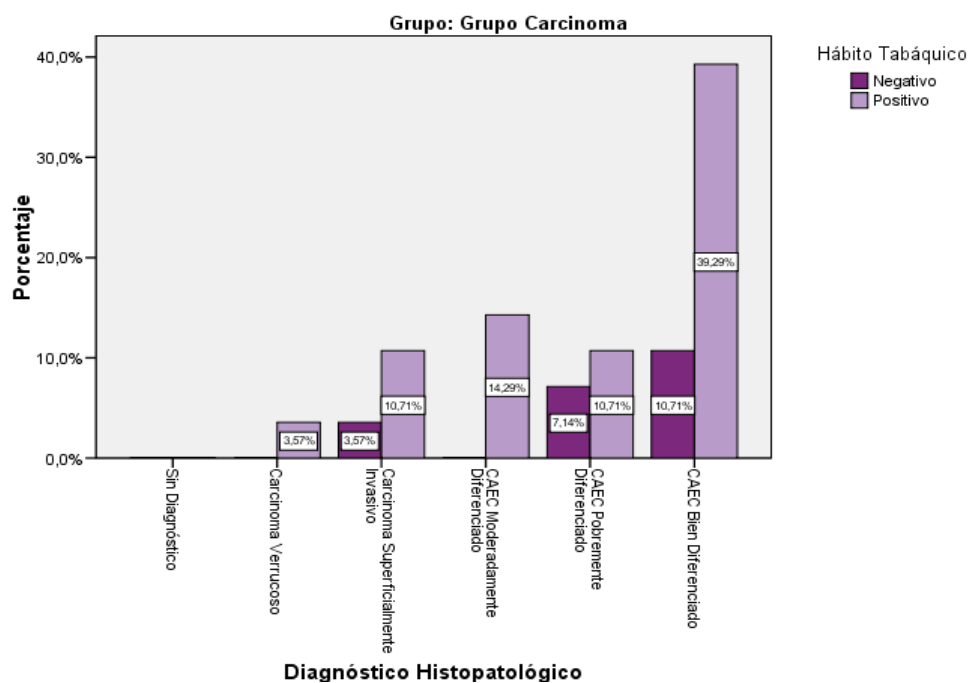
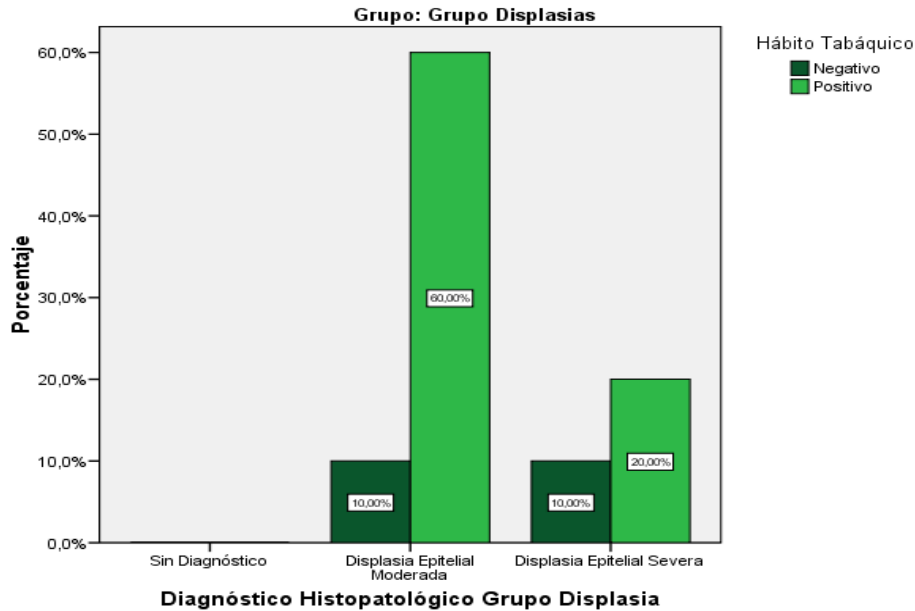


Figura 7b Relación entre hábito tabáquico y diagnóstico histopatológico en pacientes con displasia.



DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA INFECCIÓN VIRAL

7.- Evaluación molecular de Virus Epstein Barr en la muestra de pacientes con carcinoma, displasia y grupo control.

Mediante la aplicación de técnicas de Biología Molecular que incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) se detectó el genoma de VEB donde se pudo observar una banda de 265 pb representativa de la secuencia de anillamiento en base de datos M80517. En la Figura 8 se puede observar la banda 256 pb correspondiente a la región de ADN amplificado de VEB. En

el carril 6 se visualiza el marcador de peso molecular. Carril 1 y 3 las muestras de los casos positivos a la infección de VEB, en carril 2 muestra caso negativa, en el Carril 4 y 5 se observan el control positivo, y el control negativo de la prueba, respectivamente.

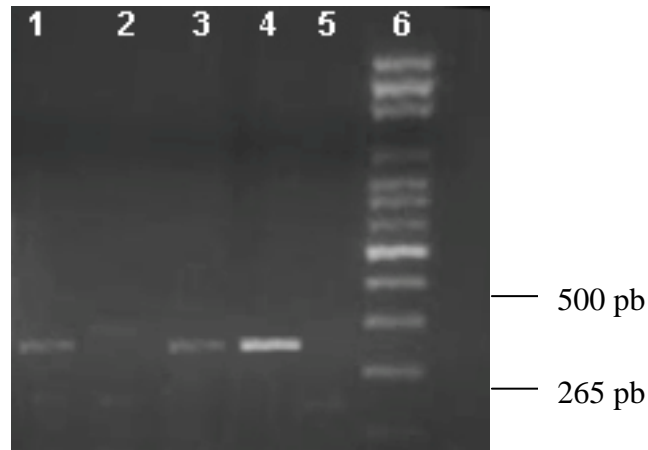


Fig.8 .Detección del virus Epstein Barr mediante PCR. 1-3) Muestras en estudio. 4) Control positivo. 5) Control negativo. 6) Marcadores de peso molecular (100 pb).

8.- Distribución de la infección por VEB en la muestra de pacientes con carcinoma, displasia y grupo control.

Comparando el grupo de pacientes diagnosticados con carcinoma y los diagnosticados con displasias, el primero presentó menor número de casos positivos a infección por VEB alcanzando sólo 3,6% (1/28) mientras que en el segundo grupo resultaron positivos 55,9% de los casos (5/10). Así mismo los casos negativos a esta infección en el grupo de

carcinoma fue del 96% (27/28) y los correspondientes al grupo de displasias alcanzaron el 44,4% (4/19). Para el grupo control no se registraron casos positivos. Las diferencias entre los grupos resultaron estadísticamente significativas ($P < 0,05$). (Tabla 10).

Tabla 10 Distribución de la infección por VEB en las muestras de pacientes con carcinoma, displasia y grupo control.

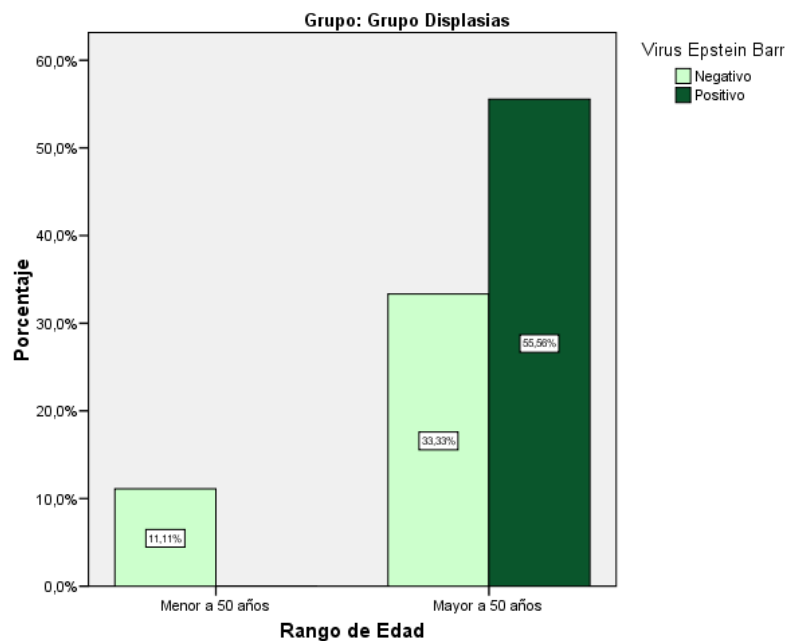
| | Virus Epstein Barr | | | |
|------------------|--------------------|------------|------------|------------|
| | Negativos | | Positivos | |
| | Frecuencia | Porcentaje | Frecuencia | Porcentaje |
| Grupo Carcinoma | 27 | 96,40% | 1 | 3,60% |
| Grupo Displasias | 4 | 44,40% | 5 | 55,60% |
| Grupo Control | 10 | 100% | 0 | 0% |

9.- Relación entre rango de edad e infección por VEB en los pacientes con carcinoma o displasia.

Para el grupo de carcinomas sólo un paciente resultó positivo a la infección por VEB y se ubicó en el rango de mayor de 50 años. En el grupo de displasias se observa que de los 5 pacientes positivos a la infección por VEB todos se encuentran en el rango de mayores 50 años, mientras que de

los pacientes que no presentan infección por este virus 3 se encuentran dentro del rango de mayores de 50 años y sólo un pacientes resulto ser menor de 50 años. Esta distribución resultó no ser estadísticamente significativa.

Figura 9 Relación entre rango de edad e infección por VEB en los paciente con displasia

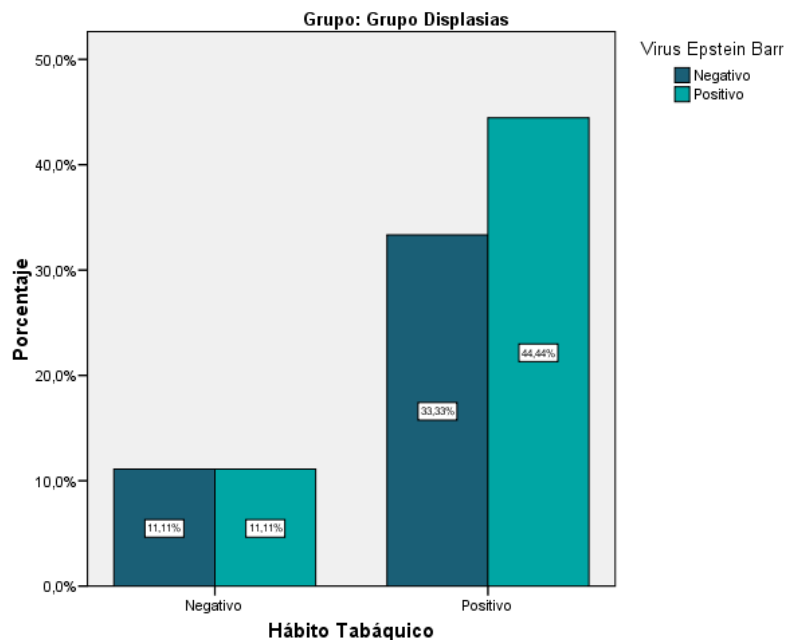


10.- Relación entre hábito tabáquico e infección por VEB en los pacientes con carcinoma o displasia.

De los pacientes con diagnóstico de carcinoma solo uno resultó infectado por VEB y refirió ser fumador. De la muestra de pacientes con

diagnóstico de displasias, 7 presentaron hábito tabáquico de los cuales 3 resultaron negativos a infección por VEB y los restantes 4 fueron positivos a la infección. Así mismo de los pacientes que negaron hábito tabáquico uno fue positivo a la infección por VEB y uno resultado negativo no siendo estas diferencias estadísticamente significativas. (Figura 10).

Figura 10 Relación entre hábito tabáquico e infección por VEB en los pacientes con displasia.



11.- Relación entre diagnóstico histopatológico e infección por VEB en el grupo de displasias.

De la muestra estudiada 4 pacientes resultaron negativos a la infección por VEB, y fueron diagnosticados histopatológicamente como

displasias epiteliales moderadas. De los pacientes positivos a la infección por VEB 2 presentaron diagnóstico de displasia epitelial moderada mientras que 3 se diagnosticaron con displasia epitelial severa. Esta distribución no resultó estadísticamente significativa.

12.- Evaluación molecular de Virus Papiloma Humano en muestra de pacientes con carcinoma, displasia y grupo control.

La identificación y tipificación del genoma de VPH se realizó mediante la aplicación del ensayo *INNO-LiPA HPV genotyping extra*, diseñado para la identificación de 28 genotipos distintos del virus de papiloma humano mediante la detección de secuencias específicas de la región L1 del genoma de VPH. Este ensayo se basa en el principio de hibridación reversa.

En la figura 11 se pueden observar las tiras con las sondas colorimétricas que identificaron los distintos genotipos de VPH presentes en cada muestra y los controles. La primera tira corresponde a la guía patrón de bandas. En la tira 1 se observó el control negativo. La tira 2 muestra un resultado negativo para la presencia de genoma de VPH, ya que se observa solamente las bandas del marcador, control del conjugado y del control ADN control de la prueba. La tira 3 muestra una banda a nivel del patrón 2 correspondiente al genotipo de bajo riesgo oncogénico (VPH 11) ; la tira 4

reveló la coinfección entre genotipos de alto y bajo riesgo oncogénico (VPH 6 banda 1 y VPH 16 banda 3); en la tira 5 se observó la presencia de infección por genotipo de alto riesgo oncogénico (VPH 52) ; en la tira 6 se evidenció genotipo de bajo riesgo (VPH 33); en la tira 7 se observó una infección única por virus de alto riesgo en este caso VPH 18 (banda patrón 12), en la tira 8 se observó infección múltiple de alto riesgo oncogénico (VPH 16 y VPH 18); la tira 9 corresponde a un caso negativo, en la tira 10 se observó el control positivo de la muestra (VPH6) y finalmente en la tira 11 se observó infección por un solo genotipo de alto riesgo (VPH 16).

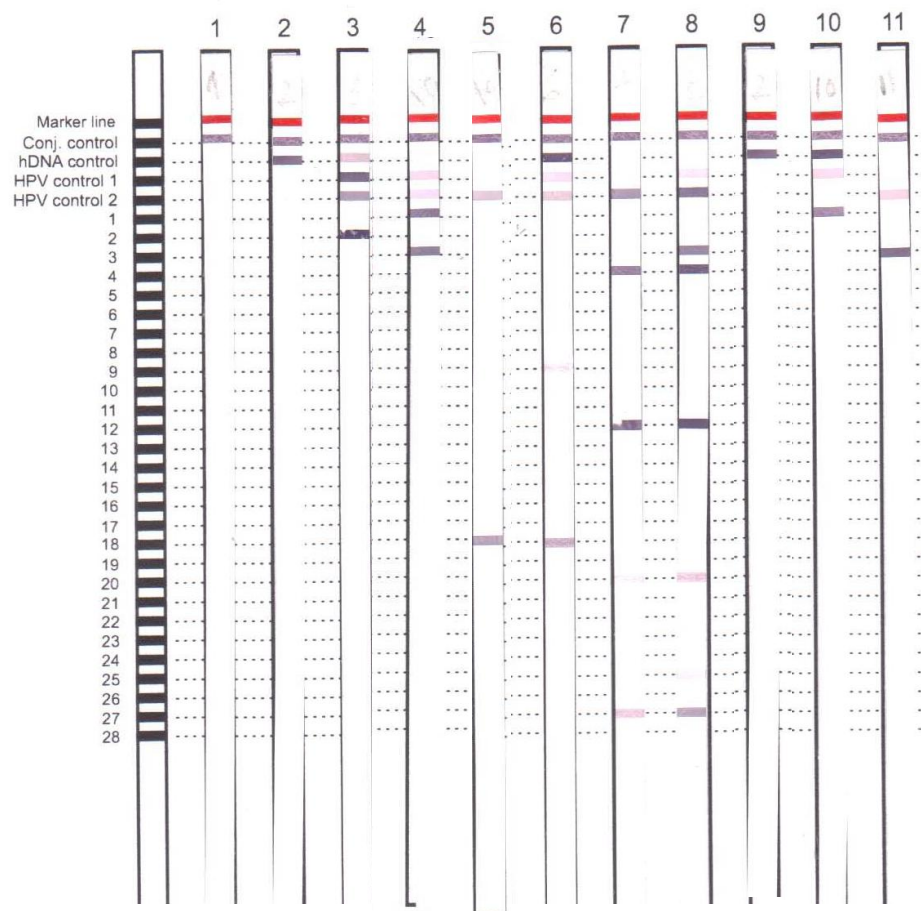


Figura 11 **Identificación y tipificación de VPH por medio de ensayo INNO LiPA HPV.** Tira 1) Control Negativo de la prueba; Tiras 3 al 8 y tira 11) Pacientes positivos para infección por VPH; Tiras 2 y 9) Pacientes negativos para infección por VPH; Tira 10) Control positivo de la prueba.

13. Distribución de la infección por VPH en la muestra de pacientes con carcinoma, displasia y grupo control.

Según la presencia de genoma viral de VPH los grupos quedaron distribuidos de la siguiente manera: en el grupo de carcinomas los casos positivos resultaron ser 17/28 (60,7%), el grupo de displasias en el que el 100% (10/10) de los casos resultaron positivos a la presencia de genoma viral. el grupo control solo resulto positivo un caso (1/10) alcanzando un 10%. Al comparar los tres grupos según el resultado positivo a infección por VPH, esta diferencia resultó estadísticamente significativa. ($P < 0,05$) (tabla 11)

Tabla 11 Distribución de la infección por VPH en al muestra de pacientes con carcinoma, displasia y grupo control.

| | Virus Papiloma Humano | | | |
|------------------|-----------------------|------------|------------|------------|
| | Negativos | | Positivos | |
| | Frecuencia | Porcentaje | Frecuencia | Porcentaje |
| Grupo Carcinoma | 11 | 39,30% | 17 | 60,70% |
| Grupo Displasias | 0 | 0,00% | 10 | 100% |
| Grupo Control | 9 | 90% | 1 | 10% |

14.- Relación entre rango de edad e infección por VPH en grupo carcinoma o displasia.

En relación a los pacientes con positividad al VPH del grupo carcinoma, 3 se encontraban en el rango de menores de 50 años y 14 en el rango de mayores de 50 años. En cuanto a los 11 pacientes negativos a la infección por VPH, 10 estaban en el rango de mayores de 50 años y solo un paciente en el rango de menores de 50 años.

En el grupo de pacientes con diagnóstico de displasia un individuo se ubicó en el rango de menores de 50 años y 9 pacientes se encontraban dentro del rango de mayores de 50 años. Esta distribución no resulto estadísticamente significativa.

15. Relación entre hábito tabáquico e infección por VPH en el grupo de carcinoma y displasia.

De la muestra con carcinoma estudiada 6 pacientes negaron hábito tabáquico, de estos 3 resultaron positivos a infección por VPH y 3 negativos. De los 22 pacientes que respondieron de forma positiva al hábito tabáquico, 8 resultaron sin infección por VPH y 14 presentaron infección por este virus. (figura 12a.) En el grupo displasias 2 de los pacientes con infección por VPH

negaron el hábito tabáquico y 8 afirmaron ser fumadores. Esta distribución no resulto estadísticamente significativa. (figura12b)

Figura 12a Relación entre hábito tabáquico e infección por VPH en el grupo de pacientes con carcinoma .

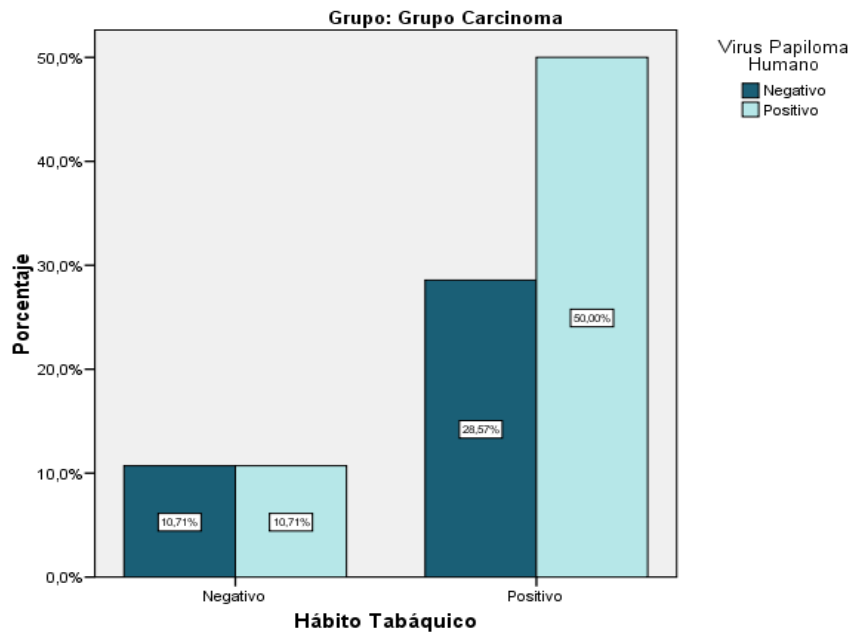
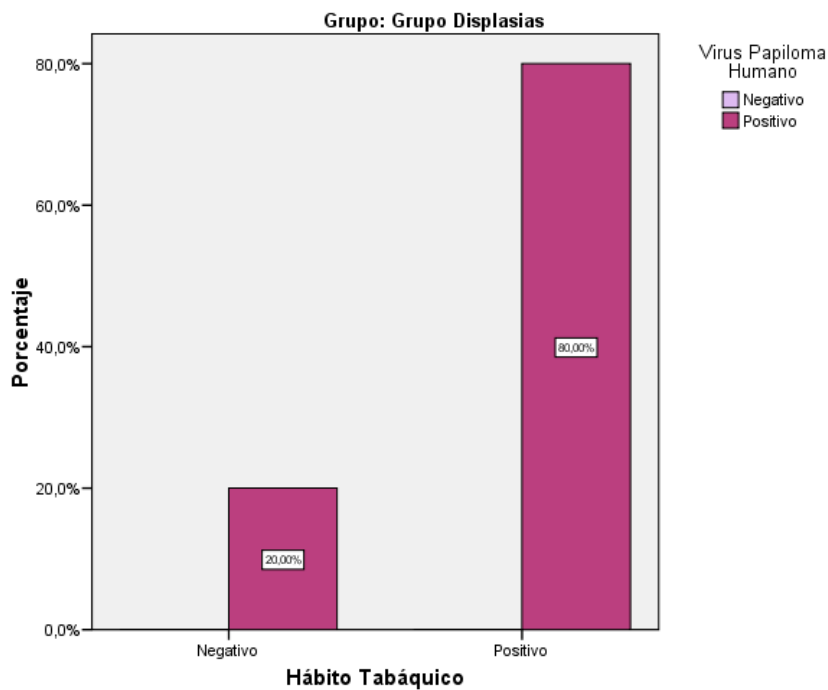


Figura 12b Relación entre hábito tabáquico e infección por VPH en el grupo de pacientes con displasia.



16.- Relación entre diagnóstico histopatológico e infección por VPH en el grupo de carcinomas.

De la muestra estudiada un paciente se diagnosticó con carcinoma verrucoso y fue positivo a infección por VPH. 4 de los pacientes de este grupo fueron diagnosticados con carcinoma superficialmente invasivo, de los cuales 3 no presentaron infección por VPH y uno si la presentó. Se diagnosticaron con CAEC moderadamente diferenciado 4 pacientes, de estos 2 presentaron infección por VPH y 2 no la presentaron. En cuanto a los pacientes con diagnóstico de CAEC pobremente diferenciado 2 no presentaron infección por VPH mientras que 3 si la presentaron. Por último 14 casos de este grupo se diagnosticaron como CAEC bien diferenciado, de los cuales 4 no presentaron infección por VPH y 10 resultaron positivos a infección por dicho virus. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

17.- Relación entre diagnóstico histopatológico e infección por VPH en el grupo de displasias.

Del grupo de pacientes con displasias, 7 fueron diagnosticados histopatológicamente como displasia epitelial moderada y la totalidad de éstos resultaron positivos a infección por VPH. Así mismo los 3 pacientes

restantes de este grupo resultaron positivos a infección por VPH y fueron diagnosticados con Displasia Epitelial Severa.

Tabla 12 Relación entre diagnóstico histopatológico e infección por VPH en el grupo de pacientes con carcinoma.

| | | Virus Papiloma Humano | |
|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------|----------|
| | | Negativo | Positivo |
| | | Recuento | Recuento |
| Diagnóstico Histopatológico | Sin Diagnóstico | 0 | 0 |
| | Carcinoma Verrucoso | 0 | 1 |
| | Carcinoma Superficialmente Invasivo | 3 | 1 |
| | CAEC Moderadamente Diferenciado | 2 | 2 |
| | CAEC Pobremente Diferenciado | 2 | 3 |
| | CAEC Bien Diferenciado | 4 | 10 |

Tabla 13 Relación entre diagnóstico histopatológico e infección por VPH en el grupo de pacientes con displasia.

| | | Virus Papiloma Humano | |
|-----------------------------|------------------------------|-----------------------|----------|
| | | Negativo | Positivo |
| | | Recuento | Recuento |
| Diagnóstico Histopatológico | Sin Diagnóstico | 0 | 0 |
| Grupo Displasia | Displasia Epitelial Moderada | 0 | 7 |
| | Displasia Epitelial Severa | 0 | 3 |

18.- Coinfección por VPH y VEB en los pacientes diagnosticados con carcinoma o displasia.

En la muestra de pacientes diagnosticados con carcinoma se observó que 17 de ellos presentaron únicamente infección por VPH, y un paciente presentó infección sólo por VEB. Ninguno de los pacientes de este grupo presentó coinfección de VPH y VEB.

En la muestra de pacientes con diagnóstico de displasia se observó que 4 pacientes resultaron positivos a la infección única con VPH mientras que los restantes 5 presentaron coinfección por VPH y VEB. Esta distribución no resultó ser estadísticamente significativa.

19.- Distribución de la muestra de pacientes con carcinoma o displasia según genotipos de VPH

En la muestra estudiada con carcinoma en relación a los genotipos de VPH identificados, como se observa en la tabla 14, el genotipo que se presentó con mayor frecuencia fue el VPH 16 que alcanzó un porcentaje de 58,8% (10/17). Los genotipos VPH 33 y VPH 11 fueron identificados en el 41.1% (7/17) respectivamente, seguidos del genotipo VPH 6 que se presentó en el 35,2% (10/27) de los casos. El genotipo VPH18 se identificó en un

29,4% de la muestra (5/17). Los genotipos menos frecuentes resultaron ser 44 y 56, con un porcentaje de 5,8% (1/17) respectivamente.

Con respecto a la muestra de pacientes con displasia, el genotipo viral que se identificó con mayor frecuencia fue el VPH 16 con un 90% (9/10) de incidencia, seguido del genotipo VPH 18 con un porcentaje de 60% (6/10). Los genotipos VPH 33 y VPH 6 fueron identificados en un 30% de las muestras (3/10) y el genotipo 11 en un 20% (2/10) de la muestra.

Tabla 14 distribución de la muestra de los pacientes con carcinoma o displasia según genotipos de VPH

| Genotipo | Carcinoma | | Displasia | |
|-------------|-----------|------|-----------|-----|
| | POSITIVO | (%) | POSITIVO | (%) |
| Genotipo 31 | 1 | 5,8 | 0 | 0 |
| Genotipo 44 | 1 | 5,8 | 0 | 0 |
| Genotipo 56 | 1 | 5,8 | 0 | 0 |
| Genotipo 6 | 6 | 41,1 | 3 | 30 |
| Genotipo 11 | 7 | 41,1 | 2 | 20 |
| Genotipo 33 | 7 | 35,2 | 3 | 30 |
| Genotipo 18 | 5 | 29,4 | 6 | 60 |
| Genotipo 16 | 10 | 58,8 | 9 | 90 |

20.- Presencia de infección por diferentes genotipos de VPH en la muestra estudiada según el riesgo oncogénico.

En la tabla 15 se correlacionan los diferentes genotipos de VPH según su riesgo oncogénico. En la población estudiada un total de 9 casos

presentaron coinfección con los genotipos 16 y 6 de VPH. 5 casos presentaron infección con los genotipos 16 y 11 de VPH. 8 casos presentaron coinfección por genotipos 16 y 33 de VPH. 8 casos presentaron coinfección con los genotipos 18 y 6 de VPH. Otros 2 casos presentaron coinfección con los genotipos 18 y 11. 7 casos presentaron coinfección por genotipos 18 y 33 de VPH. Un caso presento coinfección por los genotipos 56 y 6 al igual que un caso presentó infección por los genotipos 56 y 11 .

Tabla 15 Presencia de infección por diferentes genotipos de VPH en la muestra estudiada según el riesgo oncogénico.

| Bajo riesgo oncogénico | | VPH Genotipo 6 | VPH Genotipo 11 | VPH Genotipo 33 | VPH Genotipo 44 | VPH Genotipo 53 |
|------------------------|----------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| Alto riesgo oncogénico | | Recuento | Recuento | Recuento | Recuento | Recuento |
| VPH Genotipo 16 | Positivo | 9 | 5 | 8 | 0 | 0 |
| VPH Genotipo 18 | Positivo | 8 | 2 | 7 | 0 | 0 |
| VPH Genotipo 31 | Positivo | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| VPH Genotipo 52 | Positivo | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VPH Genotipo 56 | Positivo | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |

IV.- DISCUSIÓN

El cáncer de la cavidad bucal es considerado un problema de salud pública, ya que ocupa el lugar número once con respecto a la mortalidad producida por esta entidad (Cavalho y col; 2004). La mayoría de las neoplasias malignas de cabeza y cuello son diagnosticadas como carcinoma espinocelular (CAEC), originado en el epitelio de las vías aerodigestivas superiores: cavidad bucal, faringe y laringe (Funk y col; 2002). Este carcinoma se caracteriza por presentar una etiopatogenia multifásica y multifactorial, ya que se describen lesiones premalignas como posibles puntos de partida de la neoplasia y diferentes grados de diferenciación celular según la evolución de la patología, y se habla de multifactorial ya que es aceptado que su etiología no se debe a un agente causal único, por el contrario se describen tanto factores intrínsecos (edad, predisposición genética, entre otros) como factores extrínsecos tales como hábito tabáquico, hábitos nutricionales, factores ambientales, Infecciones adquiridas . (Zavras y col; 2001).

En recientes décadas los datos epidemiológicos y moleculares han apuntado hacia la participación de las infecciones virales como las de VEB y VPH de alto riesgo oncogénico en algunos carcinomas de cabeza y cuello. (Gillison y col; 2000) La participación de VPH en la génesis del carcinoma bucal y bucofaríngeo, se ha convertido en el principal propósito de

numerosos estudios a nivel mundial, esto basado en la siguiente evidencia: a) el potencial oncogénico ampliamente comprobado de los genotipos de VPH de alto riesgo en la patogénesis de las enfermedades neoplásicas anogenitales, en especial en el CAEC cervical (Muñoz y col; 2003). b) las similitudes morfológicas entre el epitelio bucofaríngeo y el genital. c) la naturaleza epiteliotrópica del VPH. (Thompson y col; 2001).

En cuanto a la participación del VEB en la etiología de neoplasias malignas, son escasos y controvertidos los reportes, esto debido a que los rangos de identificación de genoma de VEB en las lesiones malignas es muy amplio abarcando de 0% a 70% en diferentes estudios (Kovayashi y col; 1999) lo cual no permite ser concluyentes. Lo que si esta respaldado es que cada día son más los estudios orientados a establecer el papel de las infecciones virales en la etiopatogénea de las neoplasias de la cavidad bucal en especial del CAEC de la cavidad bucal y bucofaríngeo.

En el presente estudio se aplicaron técnicas de biología molecular para evidenciar la presencia de genoma de VPH y VEB en lesiones diagnosticadas como displasias o carcinoma espinocelular. Es importante mencionar que la gran sensibilidad y especificidad de las técnicas de biología molecular la han convertido en el método de elección para un gran número de investigaciones orientadas a establecer la relación de las infecciones virales con el desarrollo de neoplásias malignas.

En la presente investigación la población analizada en relación a la presencia de lesiones displásicas y/o carcinomas, se caracterizó por un predominio del género masculino (60%) con respecto al femenino (39.6%), lo que coincide con los reportes consultados (OMS 2005; Neville 2005; Sapp 2002.); Pintos y col; (2008) en un estudio realizado en Montreal, Canadá, reportaron que el 70.6% de su muestra eran del género masculino, mientras que el 29.2% de los pacientes eran del género femenino, estos resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio. Rivera y col, realizan un estudio epidemiológico en una población venezolana (2009) en el que el 70% de la muestra eran varones y el 30% mujeres. Aunque se toma como un hecho la prevalencia del CAEC y de las displasias en el género masculino, en la actualidad se han reportado algunas variaciones en estos patrones, sugiriendo que el rol de la mujer en la sociedad actual ha generado cambios en su actitud, cambio en sus hábitos, entre otros. Un ejemplo de estos cambio sería el aumento en el índice de mujeres fumadoras así como en el consumo de alcohol, en fin una exposición aumentada a factores de riesgo que contribuyen a aumentar la incidencia de neoplasias malignas en las mujeres.

En relación a los rangos de edad es conocida la relación de esta variable como factor de riesgo en la génesis de CAEC de la cavidad bucal y bucofarínge, sobre todo relacionado con hábitos alcohólicos y tabáquico, sin

embargo en la actualidad esta afirmación resulta cuestionable para algunos autores como Sarkaria y col; (1994) y Perez-Ordoñez,y col, (2006) quienes reportan aumento en la incidencia de tumores malignos en cabeza y cuello en pacientes jóvenes, por lo general asociados a otras patologías concomitantes. En la presente investigación el rango de edades de los pacientes de los grupos casos, osciló entre los 44 y 81 años para el grupo carcinoma, siendo la edad promedio 63.2 años y para el grupo de displasias, el rango fue de 22 a 61 años con un promedio de edad de 52.8. El rango de edad en que se presentó la enfermedad con mayor frecuencia fue el de mayores de 50 años, resultado similar a los obtenidos por Liuzzi y col (2006) donde la edad promedio fue 61.9 años, y el grupo etáreo que con mayor frecuencia presento tumor fue el de 60 a 69 años. Se sugiere que las patologías estudiadas tienden a afectar a adultos de edad mediana y avanzada, pero igualmente pueden afectar a individuos más jóvenes. (Sapp 2001, Neville 2002).

En cuanto a la localización de las lesiones, en el presente estudio los CAEC fueron identificados con mayor frecuencia en reborde alveolar (35.5%) seguido de orofaringe (28.6%). Estos resultados presentan similitudes con los obtenidos por Correnti y col (2004) en el estudio realizado en Venezuela, en el que la localización más común fue la mucosa del reborde alveolar. Sin embargo los resultados difieren de otros estudios donde la localización más común resultó ser en lengua (Pintos y col; 2008).

En referencia al diagnóstico histopatológico, en el presente estudio, para el grupo de pacientes con carcinoma, el diagnóstico más frecuente resultó ser CACE bien diferenciado con un notable 50%, seguido por CAEC pobremente diferenciado (17.9%). Estos resultados difieren con los de algunos estudios realizados previamente en el país, como el de Ponce y col (2008) en el que el 59.8% de los 52 pacientes estudiados, fueron diagnosticados con CAEC con un grado de diferenciación moderado seguido de un 33.6% de CAEC bien diferenciados, lo que coincide con el reporte de Liuzzi y col (2007) igualmente en Venezuela, en el que el 24.14% de los casos tienen un diagnóstico de CAEC bien diferenciado, mientras que los grados de diferenciación moderado y pobre presentaron 37.93% respectivamente.

Al evaluar el hábito tabáquico se pudo observar que un porcentaje importante de los paciente que participaron en el estudio (62.5%) tenían el hábito de fumar cigarrillos, específicamente del grupo carcinoma 78.6% de los pacientes resultaron fumadores así como del grupo displasia el 80% de los pacientes también afirmaron fumar cigarrillos lo que sustenta la afirmación de que el hábito tabáquico representa un importante factor etiológico de las transformaciones de las células epiteliales del tracto aerodigestivo superior tal como lo indican algunos autores. El uso de alcohol y tabaco son los factores que más se han asociado con la presencia de

enfermedad, de hecho casi todos los trabajos asocian al tabaquismo con el cáncer bucal en más del 70% (Neville 2005, OMS 2005, Sapp 2002, Varela 2007, Carvalho y col; 2004).

Las coincidencias de los resultados de la investigación con los de otros estudios previos son múltiples, Rivera y col; (2008) reportaron 64/130 pacientes fumadores (49.2%) en su estudio, En el año 2007 Liuzzi y col; realizaron un estudio sobre Factores Pronóstico en el Carcinoma de Células Escamosas de Cavidad Oral, en el que obtuvieron como resultado que el consumo de tabaco en cualquiera de sus formas (cigarrillo, tabaco, chimó, pipa) fue el antecedente de mayor importancia que se observó, evidenciándose que el 67.39% de los pacientes tuvo contacto con tabaco por lo menos por un año continuo previo a su evaluación.

Al relacionar en la presente investigación el hábito tabáquico de los pacientes estudiados con los diagnósticos histopatológicos, se evidenció una interrelación notoria, de los 14 pacientes con diagnóstico de CAEC bien diferenciado 11 fueron fumadores, por otra parte de los 4 pacientes diagnosticados con CAEC moderadamente diferenciado y con Carcinoma superficialmente invasivo, respectivamente, la totalidad afirmaron ser fumadores de cigarrillos y para el grupo de pacientes con diagnóstico de CAEC pobremente diferenciado 3/5 aseguraron fumar cigarrillos. En cuanto a los pacientes con diagnóstico de displasia epitelial moderada, 6/7 afirmaron

fumar y 2/3 de los pacientes diagnosticados con displasia epitelial severa resultaron fumadores.

Todos los resultados planteados respaldan los datos epidemiológicos que califican el consumo de tabaco en cualquiera de sus presentaciones como un factor etiológico contribuyente de los cambio neoplásicos en los tejidos bucales.

De igual forma se deben considerar los otros factores identificados como etiológicos para el desarrollo de carcinomas bucales y bucofaríngeos como lo son las infecciones bacterianas, las micóticas y las infecciones virales. En años reciente la identificación constante de genoma viral de VPH y VEB en especímenes tumorales ha promovido la realización de estudios orientados a establecer la verdadera correlación de estas infecciones con la etiopatogenia de carcinoma de cabeza y cuello y su valor diagnóstico y pronóstico. (Bin y col; 2008, Hermann y col; 2004)

En este estudio se tomo en cuenta la variable de infección por VEB. En el caso de los pacientes diagnosticados con displasias el porcentaje de incidencia de infección por VEB fue considerable (55%). En el grupo de pacientes con diagnóstico de carcinoma sólo un individuo presentó infección por VEB. Un resultado similar refirió Kobayashi y col (1999) quienes en una muestra estudiada de 21 pacientes sólo una paciente resulto positivo a la presencia de genoma viral de VEB, y fue asociado a un estado

inmunosuprimido del paciente. Otros estudios han reflejado resultados muy diferentes, Sand y col; (2002) obtuvieron un 37.9% de casos positivos a infección por VEB en una muestra de pacientes con diagnóstico de CAEC en cavidad bucal. Higa y Col; (2003) en Japón, reportaron 36% de casos con identificación de genoma de VEB en tumores de CACE en cavidad bucal. Bagan y col (2007) publicaron un estudio preliminar en el que evaluaron la infección por VEB en pacientes con diagnóstico de Leucoplasia Verrucosa Proliferativa (LVP), En el subgrupo 1 conformado por 10 pacientes con diagnóstico de LVP, 6 habían desarrollado CAEC en cavidad bucal y de ellos tres resultaron infectados por VEB. Los 4 pacientes restantes del subgrupo habían desarrollado cierto grado de displasia epitelial, reportaron 2 (50%) con positividad a presencia de genoma de VEB, lo cual es similar a los resultados arrojados por el presente estudio. En cuanto al sub grupo 2 conformado por 4 pacientes con diagnóstico de CACE el 40% resultó positivo a la infección por VEB.

Estos resultados variables sugieren la necesidad de continuar diseñando investigaciones con un número de muestras significativas y con técnicas de detección de VEB lo suficientemente sensibles y específicas para poder obtener resultados concluyentes acerca de el papel de la infección por VEB en el desarrollo de carcinoma en la cavidad bucal y bucofarínge.

Al relacionar los casos positivos a infección por VEB con los rangos de edad en el estudio, se determinó que la totalidad de los casos se ubicaron en el rango de mayores de 50 años, al igual que los casos presentados por Bagan y col (2007) cuyo rango de edad osciló entre 53 y 90 años, y Ponce y col; (2006) refiere un promedio de edad de 55 años. Lo que orienta a concluir que la tendencia de la infección por VEB es a presentarse en adultos mayores.

Otra relación importante encontrada en el estudio fue la establecida entre el hábito tabáquico y la infección por VEB en los pacientes con diagnóstico de displasia donde todos los pacientes que afirmaron fumar (44.4%) presentaron infección por VEB, este porcentaje es menor al reportado por Ponce y Col; (2006) de 80.5% en pacientes de la muestra positivos al hábito tabáquico.

En cuanto a la relación establecida entre el diagnóstico histopatológico y la infección por VEB se pudo observar en la investigación, que la presencia de genoma viral tanto en las displasias epiteliales moderadas (2/6) como en la displasias epiteliales severas (3/3), no es posible establecer comparaciones por lo escaso de los reportes de esta relación, pero se podría inferir que la relación entre infección por VEB y el consumo de tabaco inhalado representa un factor de riesgo para que ocurran cambios displásicos. (Neville 2002)

.Otro factor que se considera etiológico de cambios celulares, que pueden llegar a producir cambios neoplásicos por el potencial oncogénico de alguno tipos virales, es la infección por VPH. Hoy en día es aceptada la participación de este virus como factor de riesgo del cáncer de cuello uterino así como su participación en la incidencia de CAEC en la cavidad bucal y bucofarínge.

En este estudio se observó un considerable 60.7% de casos positivos a infección por VPH en el grupo de pacientes con diagnóstico de carcinoma. Este resultado puede compararse con los publicados por Kreimer y col; (2005) quien en un estudio epidemiológico donde evaluaron 5046 casos de CAEC en cabeza y cuello, correspondientes a 60 estudios a nivel mundial, determinaron una incidencia de 25.9% de infección por VPH, específicamente en la cavidad bucal se tomaron 2642 casos de CAEC y 969 en bucofarínge; el 23% de los casos en cabeza y cuello resultaron positivos a la infección por VPH y 35.6% de los casos localizados bucofarínge presentaron positividad a genoma de VPH. Presentando resultados similares en cuanto a al identificación de VPH en CAE, se debe mencionar estudios en Asia (Japón) donde Sugiyama y col; (2003) en un total de 86 casos determinaron presencia de VPH en 30 individuos alcanzando un 34.8%. En India Nagpal y col; (2002) de una muestra de 110 individuos, por medio de RCP, determinaron 37 casos positivos a infección por VPH (33.6%).

Fregonesi y col (2003) en Brasil de una muestra de 46 pacientes, aplicando Hibridación *in situ* obtuvieron 39% de casos positivos a VPH. En Venezuela, Premoli De Percoco y col; (2001) identificaron infección por VPH en 60% de su muestra de 50 pacientes. Correnti y col; (2004) utilizaron RCP en 16 pacientes con diagnóstico de CAEC y el 50% resultaron positivos a infección por VPH de alto riesgo oncogénico. Todos estos estudios al igual que el presente respaldan el hecho de que el VPH tiene una participación importante en el desarrollo de CAEC en la cavidad bucal y bucofarínge.

Otro resultado sin dudas importante de esta investigación es el porcentaje de displasias asociadas a infección por VPH. De los 10 casos de displasia el total resultó positivo a la presencia de genoma de VPH; esto podría sugerir que aunque el tejido presenta cambios displásicos, aun conserva las condiciones necesarias para brindarle al virus el ambiente idóneo para replicarse en el epitelio, al mismo tiempo que está promoviendo el cambio del mismo y alterando la transcripción de genes en las células que modifican su ciclo celular normal.

Si bien es aceptado el potencial que tienen algunos tipos de VPH de alto riesgo oncogénico, para producir alteraciones irreversibles en las células epiteliales al integrar fragmentos de su genoma en el de la célula infectada, y alterar su ciclo celular, produciendo una multiplicación descontrolada, también es conocido el efecto que tiene el hábito tabáquico como factor

etiológico de cambios epiteliales tanto benignos como malignos. En este estudio se determinó la relación existente entre el consumo de tabaco inhalado y la infección por VPH. De los pacientes diagnosticados con CACE la mayoría presentaron infección por VPH (14/22) al igual que en los pacientes con diagnóstico de displasias donde la relación es más estrecha (8/10).

Estos datos respaldan el hecho de que el CAEC es una entidad con una etiología multifactorial. Pintos y col (2008) determinaron en su estudio que el 39% del grupo de pacientes con diagnóstico de carcinoma eran fumadores. Liuzzi y col; en Venezuela (2007) determinaron que el 79% de su muestra eran fumadores, de los cuales 27.59% fueron fumadores antiguos de los cuales 20% presentaba infección por VPH , mientras que 51.72% eran fumadores actuales y 70% de ellos resultaron positivos a la infección por VPH, lo que sugiere que hay una concomitancia en el efecto sobre de el tejido de ambos factores.

Desde el punto de vista histopatológico sería interesante establecer que relación existe entre la presencia de infección por VPH y los cambios celulares de los tejidos. En el presente estudio, Al cruzar estas dos variables se pudo observar que en la medida que el tejido infectado presentaba mayores cambios estructurales, menor era la expresión del virus. En otras palabras a menor grado de diferenciación de los carcinomas menor fue la

frecuencia de presencia de genoma viral, sin embargo en el caso de las displasias epiteliales no se vio este patrón pues todos los casos resultaron positivas a la presencia de genoma de VPH. En el estudio los casos diagnosticados con CAEC pobremente diferenciados 3/5 presentaron infección por VPH, relación notablemente menor que en el casos de los pacientes con diagnóstico de CAEC bien diferenciados presentaron 10/14 infección por VPH y para el grupo de displasias epiteliales la totalidad resultó positiva a infección por VPH. Liuzzi y col; en su trabajo de tipificación de VPH en CAEC en cabeza y cuello realizado en Venezuela (2007), encontró la siguiente relación según el grado tumoral, de los 7 casos de CAEC bien diferenciado 4 (40%) resultaron positivos a infección por VPH, del total de 11 casos de CAEC moderadamente diferenciados 4 resultaron positivos a VPH; por último de los 11 casos de CAEC pobremente diferenciado sólo 2 fueron positivos a infección por VPH, repitiéndose en su estudio la tendencia de la investigación que se presenta.

Este comportamiento podría justificarse en las características de la etiopatogenia de la infección por VPH, el cual al tener un carácter epiteliotrópico (Ha y col; 2004) necesita de un tejido que le ofrezca células funcionales para poder replicarse, lo cual ocurrirá hasta el punto en que el tejido, por efecto incluso del mismo virus, presente cambios irreversibles como pleomorfismo, incluso necrosis que lo convertirán en un terreno poco fértil para la replicación del virus.

Así como se reportan coinfecciones por diversos genotipos de un mismo virus, también es conocida la coinfección por diferentes virus, siendo esto uno de los motivos de estudio de la presente investigación.

Son controversiales los resultados obtenidos en investigaciones previas y escasos los reportes al respecto. En el presente estudio se pudo observar que de los 10 pacientes diagnosticados con displasia, 5 presentaron coinfección por VEB y VPH. Mientras que en el grupo de pacientes diagnosticados con carcinoma, no existieron asociaciones de estos virus. Este resultado hace pensar en la posibilidad de que la condición de malignidad sea inversamente proporcional a la presencia de infección por VEB en estas lesiones, sin embargo no es posible afirmarlo antes de tomar en cuenta algunos factores como el tamaño de la muestra, técnica de identificación viral, características de la muestra, entre otros. Igualmente surge la interrogante sobre el origen de la presencia de genoma de VEB, si se encontró el virus en las células de l tejido epitelial o su presencia se debe a una respuesta inmunitaria, por medio de la migración al sitio de la lesión de linfocitos B, en respuesta a una alteración del tejido. Estas interrogantes podrían despejarse aplicando técnicas de Biología molecular adicionales como la hibridación *in situ*.

Ahora bien ya establecidas las frecuencias de infección por genoma de VPH y su relación con el hábito tabáquico y con los distintos diagnósticos

histopatológicos el estudio permite establecer la frecuencia de infección por VPH según el genotipo viral y el riesgo oncogénico de estos.

Como es conocido, son muchos los genotipos de VPH descritos en múltiples estudios, y estos se han clasificado según su nivel de riesgo oncogénico en genotipos de alto riesgo oncogénico (16.18.31.33.39.45.51.52.56.58) y los de bajo riesgo oncogénico (6.11.13.40.42.53.54.57) (Huang y col; 2008, Baez y col; 2004, Suarez y col; 2000) De estos tipos los comúnmente identificados en la cavidad bucal son 6, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35 y 57. Los tipos 13 y 32 son exclusivos de la cavidad bucal.

En la presente investigación se identificaron 8 genotipos distintos de VPH. De los 17 pacientes con carcinoma positivos a VPH estudiados, el genotipo más frecuentemente identificado, fue el VPH 16 (58,8%) de alto riesgo oncogénico. El otro genotipo de alto riesgo oncogénico identificado fue VPH 18 (29,4%). Los de bajo riesgo oncogénico más comúnmente observados fueron VPH 33 y VPH 11 con 41,1% respectivamente, VPH 6 (35,2%), y los genotipos VPH 56 y VPH 44 con un porcentaje de 5,8% respectivamente.

En relación a los pacientes con displasia los genotipos de VPH más comúnmente identificados fueron VPH 16 (90%); VPH 18 (60%); VPH 6 (30%); VPH 33 (30%); VPH 11 (20%)

Estos resultados son comunes a muchos estudios previamente realizados a nivel mundial. Patima y col; (2000) en China, en una muestra de 54 pacientes, identificaron como genotipos más comunes VPH 16 y VPH 18 (74%) asociados a CAEC en cavidad bucal. Badarocco y col; (2000) al estudiar 24 pacientes positivos a VPH en Italia, identificaron los genotipos VPH 16 y VPH 6 (36%) como los más comunes asociados a CAEC en cavidad bucal. Nemes y col; (2006) en Hungría, tomando una muestra de 79 pacientes, identificaron el genotipo VPH 16 (41,7) como el más común asociado a su muestra de CAEC de cavidad bucal.

Por otra parte en un estudio publicado por Kreimer y col;(2005), en el cual refieren la prevalencia de VPH en CAEC en cabeza y cuello, según la localización clínica y localización geográfica, se obtuvieron los siguientes resultados, en 15 estudios realizados en Europa con un total de 774 casos de CAEC en cavidad bucal, la prevalencia del genotipo VPH 16 fue de 10.8%. En 8 estudios realizados en Norte América con 577 casos reportados, determinaron una prevalencia de 10.1% de genotipo VPH 16. En 13 estudios realizados en Asia, con un total de 1133 casos presentaron una prevalencia de genotipo VPH 16 de 22.3% y finalmente de dos estudios con 188 casos,

reportados en Centro y Sur América la prevalencia del genotipo VPH 16 fue de 14.9%. En Venezuela, Premoli De Percoco y col; (2001), reportan como los genotipos más comunes en su estudio, los genotipos VPH 16 y VPH 18. (60%)

Los estudios consultados sugieren una participación importante de los genotipos de alto riesgo VPH 16 y VPH 18, en los casos diagnosticados como CAEC de cavidad bucal, sin embargo no se debe descartar el hecho de que en menor proporción, pero igualmente con frecuencia, se identifican genotipos de bajo riesgo oncogénico como VPH 6, VPH 11 y VPH 33, muchas veces asociados a otros genotipos de alto riesgo oncogénico.

En relación a las infecciones por múltiples genotipos de VPH, el presente estudio sugiere asociaciones frecuentes entre genotipos de bajo y alto riesgo oncogénico. En 9 de los 27 casos diagnosticados con infección por VPH, fueron tipificados los genotipos VPH 6 y VPH 16, en un mismo paciente causando infección múltiple. En 8 de 27 casos se presentaron asociados el genotipo VPH 18 (alto riesgo oncogénico) y VPH 6 (bajo riesgo oncogénico). Igualmente 8 casos presentaron infección múltiple por VPH 16 y VPH 33. Por último 7 casos reportaron infección combinada por los genotipos VPH 18 y VPH 33. Estos resultados sugieren una frecuente coinfección por varios genotipos virales de diferentes riesgos oncogénicos en

un mismo paciente. Esta relación por lo general incluye VPH 16 y VPH 18, asociados a VPH6, VPH 11 y VPH 33.

Estos resultados se presentan similares en algunos estudios previos como el de Termine y col; (2008), en el que se citan 62 estudios a nivel mundial de CAEC de cabeza y cuello, en los cuales se evidencia, con gran frecuencia, la infección por varios genotipos de VPH asociados, por lo general el VPH 16, VPH 18, VPH 6 y VPH 11. (Tachez y col; 2005, Yang y col; 2004). También se reportan estudios en cavidad bucal que relacionan estos genotipos virales como causantes de coinfecciones, asociando los genotipos VPH 16, VPH 18, VPH 6, VPH 11 y VPH 33 (Kansky y col; 2003, Fragonesi y col; 2003, Ritchie y col; 2003). Estos resultados sugieren varios escenarios, el primero que los genotipos de bajo riesgo, fuesen los responsables de la infección primaria produciendo alteraciones celulares benignas, las que a consecuencia de una infección secundaria por genotipos de alto riesgo oncogénico progresan en mutaciones por alteraciones genéticas acumulativas que desencadenen expansiones clonales descontroladas. El otro escenario planteado sería que los genotipos virales de alto riesgo produzcan la primo infección facilitando la infección y multiplicación de los genotipos virales de bajo riesgo, ocurriendo una especie de sinergismo entre ambos. Tomando en cuenta estas alternativas y los resultados obtenidos, sería interesante establecer el valor pronóstico de

estas asociaciones, así como de las infecciones persistentes producidas por un genotipo viral a la vez.

En un estudio realizado por Liuzzi y col; (2006) fue reportado como parte de los resultados que 92,39% de los pacientes incluidos en el estudio consultó al especialista por presentar lesiones tumorales en la cavidad bucal. En el mismo estudio los autores determinaron como uno de los factores pronóstico más importante, la tardanza de consultar al médico.

Estas citas del estudio realizado en Venezuela, llevan a la reflexión sobre el importante papel que tiene el profesional de la Odontología y del especialista en Cirugía bucal, en el despistaje y detección temprana de las lesiones malignas en cavidad bucal, para lo cual es necesario el conocimiento de las bases teóricas de la patología bucal, lo que permitiría afirmar que “no hay buen cirujano que no tenga conocimientos de patología”. Esta visión integral confiere al odontólogo cirujano la calificación de Profesional de la salud, no solo de la cavidad bucal sino también sistémica del individuo.

El tipo de investigación, como la que aquí se presenta, demuestra la importancia de la incorporación del cirujano Bucal y del profesional de la

odontología en general, en el campo biomédico y a la familiarizarse con la interpretación de los resultados de diagnóstico molecular de aplicación, cada vez más frecuentes en el área de la salud, lo cual permitiría abordar adecuadamente el diagnóstico, pronóstico y terapéutica del paciente.

En el diagnóstico de las lesiones benignas, premalignas y malignas, es esencial que se realice una rápida identificación con el fin de establecer el comportamiento de las diferentes entidades patológicas y en consecuencia, la conducta a seguir.

Es muy importante, con relación a las lesiones en cavidad bucal, el diagnóstico precoz por parte del Odontólogo /cirujano bucal, debido a que las lesiones pueden ser tan incipientes o asintomáticas que el mismo paciente puede ignorar su existencia.

V.- CONCLUSIONES

El diagnóstico de lesiones de Carcinoma de células escamosas y displasias en la cavidad bucal y bucofarínge, fue predominante en el género masculino con hábito tabáquico, en el rango de edad de mayores de 50 años y localizadas con mayor frecuencia en el reborde alveolar.

El diagnóstico histopatológico predominante es Carcinoma Espinocelular bien diferenciado y Displasia epitelial moderada. El hábito tabáquico es el factor etiológico extrínseco más comúnmente relacionado a la enfermedad.

Las técnicas de Biología molecular, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa , brindan la suficiente sensibilidad y especificidad para determinar la presencia de genoma de Virus Epstein Barr y la tipificación Virus Papiloma Humano.

La infección por Virus Epstein Barr en la cavidad bucal y bucofarínge, es común en tejidos que presentan cambios displásicos moderados y severos. La presencia de infección por Virus Epstein Barr es más frecuente en los pacientes mayores de 50 años fumadores.

La infección por Virus Papiloma Humano fue encontrada en displasias moderadas y severas y en carcinomas espinocelulares, en la cavidad bucal y bucofarínge, en pacientes mayores de 50 años y con hábito tabáquico.

El grado de diferenciación que se presenta con mayor frecuencia es el bien diferenciado y la mayoría fueron positivos para el genoma de Virus Papiloma Humano.

La coinfección por Virus Papiloma Humano y Virus Epstein Barr, se presenta con frecuencia en pacientes con diagnóstico de Displasia epitelial de moderada o severa.

Los genotipos de Virus Papiloma Humano más frecuentemente identificados son: VPH 16 y VPH 18 seguidos de los genotipos VPH 6, VPH 11, VPH 33.

Las asociaciones de varios genotipos de Virus Papiloma Humano identificadas en lesiones de carcinoma espinocelular y displasias en la cavidad bucal y bucofaringe son las que incluyen VPH 16 y VPH 6, VPH16 y VPH 33, VPH 18 y VPH 6, VPH 18 y VPH 33.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D. Globocan 2002: cancer incidence and mortality worldwide. Vol. version 2.0. Lyon France: IARC, 2004.
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pasini P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001; 94:153-6.
3. J, Eversole L, Wysocki G. Patología Oral y Maxilofacial Contemporánea. 2º edición .Mosby, Madrid España 2005.
4. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head And Neck Cancer. *N Engl J Med* 2001; 345 (26): 1890-900.
5. Javier Pintos, Martin J. Black, Nader Sadeghi, Parviz Ghadirian, Anthony G. Zeitouni, Raphael P. Viscidi, Rolando Herrero, François Coutlée and Eduardo L. Franco Human papillomavirus infection and oral cancer: A case-control study in Montreal, Canada *Oral Oncology, Volume 44, Issue 3, March 2008, Pages 242-250.*
6. Bin Huang, Huangqin Chen and Mingwen Fan . A postulated role for human papillomavirus (HPV) in the transformation and proliferation of oral squamous cell carcinoma (OSCC) *Medical Hypotheses, Volume 70, Issue 5, 2008, Pages 1041-1043.*
7. Alice Y. Chuang, Tony C. Chuang, Steven Chang, Shaoyu Zhou, Shahnaz Begum, William H. Westra, Patrick K. Ha, Wayne M. Koch, Joseph A. Califano. Presence of HPV DNA in convalescent salivary rinses is an adverse prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma *Oral Oncology, In Press, Corrected Proof, Available online 7 March 2008*
8. Tyan Y-S, Liu S-T, Ong W-R, Chen M-L, Shu C-H, Chang Y-S. Detection of Epstein Barr virus and human papillomavirus in head and neck tumors. *J Clin Microbiol*1993;189:12-9

9. Cruz L, Van Den Brule AJC, Walboomers JMM, et al. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinomas, premalignant lesions and normal mucosa- a study using the polymerase chain reaction. *Oral Oncol* 1997;33:182-8.

10. Luizzi, Jua, Estanga, Ninoska, Castillo, Libia et al. Tipificación del virus del papiloma humano en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. *Rev. venez. oncol.*, sep. 2007, vol.19, no.3, p.210-218. ISSN 0798-0582.

11. R. M. Hermann, L. Füzesi, O. Pradier, H. Christiansen and H. Schmidberger Presence of human papillomavirus-18 and Epstein-Barr virus in a squamous cell carcinoma of the tongue in a 20-year-old patient. Case report and review of the current literature *Cancer/Radiothérapie, Volume 8, Issue 4, August 2004, Pages 262-265.*

12. Correnti M, Rivera H, Cavazza M. Detection of human papillomaviruses of high oncogenic potential in oral squamous cell carcinoma in a Venezuelan population. *Oral Diseases*. Vol 10,number 3,May 2004, pp 163-166

13. Cruz L, Brule A, Brink A et al. No direct role of Epstein-Barr virus in oral carcinogenesis: a study at the DNA, RNA and protein levels. *Int J Cancer* 2000; 86:356-61.

14. Ikuta K, Satoh Y, Hoshikawa Y, Sairenji T, Detection of Epstein-Barr virus in salivas and throat washings in healthy adults and children. *Microbes Infect* 2000;2:115-20.

15. D'Costa J, Saranath D, Sanghvi V, Mehta AR. Epstein-Barr virus in tobacco-induced oral cancers and oral lesions in patient from India. *Oral Pathol Med* 1998;27:78-82

16. Lars Peter Sand, Jamshid Jalouli, Per-Anders Larsson and Jan-Michael Hirsch Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus, and normal oral mucosa *Oral Surgery*,

17. Kobayashi I, Shima K, Saito I, Kiyoshima T, Matsuo K, Ozeki S, et al. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 1999;189:34-9.
18. Baez A, Almodovar JI, Cantor A, Celestin F, Cruz-Cruz L, Fonseca S, et al. High frequency of HPV16-associated head and neck squamous cell carcinoma in the Puerto Rican population. *Head Neck*. 2004;26(9):778-84.
19. Herrero X, Castellsagué M, Pawlita J, Lissowska FK, Prabda B. Human Papillomavirus and Oral Cancer: The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(23):1772-1783
20. Pérez-Ordoñez, Beauchemin, Jordan. Molecular biology of Squamous cell carcinoma of the head and neck. *J. Clin. Pathol*. 2006;59;445-453.
21. Ben-Izak, Kablan, Laster, Nagler. Oropharyngeal cancer pathogenesis: Ubiquitin proteolytic, apoptotic and epidermal growth factor related pathways act in concert-first report. *Oral Oncology* 2005 41,851-860.
22. Termine, Panzarella, Falaschini, Matanga, Lo Muzio, Campisi. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta analysis. *Annals of Oncology* 19_ 1681-1690,2008.
23. Bagan J, Jiménez Y, Murillo, Poveda R, Diaz JM, Gavaldá C, Margaix M, Scully C, Alberola TM, Torres-Puente M, Pérez-Alonso M. Epstein-Barr virus in oral proliferative verrucous leukoplakia and squamous cell carcinoma: a preliminary study. *Med Oral Patol Cir Bucal*. Feb 1;13(2):E110-3

24. Ha P, Califano J. The Role of Human Papillomavirus in Oral Carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 15 (4) : 188-196 (2004)
25. Sand, Jalouli, Larsson, Hirsch. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus, and normal oral mucosa. *Oral, sur Oral Med Oral Pathol Oral radiol endod* 2002;93:586-92.
26. Correnti M, Rivera H, Cavazza M. Detection of human papillomaviruses of high oncogenic potential in oral squamous cell carcinoma in a Venezuelan population. *Oral diseases*, Vol 10, Num 3, May 2004, pp 163-166.
27. Franceschi Silvia, Muñoz Nubia, Snijders Peter. How Strong and how wide is the link between HPV and oropharyngeal cancer. *The Lancet.* Vol 356, sep 2000.
28. Kreimer A, Clifford G, Boyle P, Franceschi S. Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell carcinomas worldwide: A systematic review. *Cancer epidemiology biomarkers and Prevention* vol 14, 467-475, February 2005.
29. Negri E, La Vecchia C, Franceschi S, Tavani A. Attributable Risk for Oral Cancer in Northern Italy. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1993;2:189-193.
30. Garrote LF, Herrero R, Reyes RM, Vaccarella S, Anta JL, Ferbeye L, Muñoz N, Franceschi S. Risk factors for cancer of the oral cavity and oro-pharynx in Cuba. *Br J Cancer.* 2001; 85:46-54.
31. Varela Centelles, Pablo I., Romero Mendez, Amparo, Varela Centelles, Almudena *et al.* Riesgo de cáncer oral atribuible al consumo de alcohol y tabaco en la Zona de Salud de Burela (Lugo). *RCOE.* [online]. 2007, vol. 12, no. 3 [citado 2009-02-21], pp. 177-181.

32. Stewart BW, Kleihues P. World Cancer Report. Geneva: International Agency for Research on Cancer, 2003:232–6.
33. Canadian Cancer Society. Canadian Cancer Statistics 2005 (www.ncic.cancer.ca).
34. van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, et al. Frequent loss of chromosome 9p21–22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res* 1994;54:1156–8.
35. Rosin MP, Cheng X, Poh C, et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res* 2000;6:357–62
36. Nawroz H, van der Riet P, Hruban RH, et al. Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1994;54:1152–5.
37. Shahnavaaz SA, Regezi JA, Bradley G, et al. p53 gene mutations in sequential oral epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. *J Pathol* 2000;190:417–22.
38. Boyle JO, Hakim J, Koch W, et al. The incidence of p53 mutations increase with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* 1993;53:4477–80.
39. Meredith SD, Levine PA, Burns JA, et al. Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. Association with poor prognosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;121:790–4.
40. Ha PK, Califano JA. The role of Human Papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit rev Oral Biol Med*. 2004; 15 (4): 188-196
41. Premoli-De-Percoco, G; Ramírez, JL. Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de los Andes,

Mérida, Venezuela. High risk human papillomavirus in oral squamous carcinoma:evidence of risk factors in a Venezuelan rural population. Preliminary report. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001 Jul; 125 (1): 1-9

42. Capote Negrin, Luis G. Aspectos epidemiológicos del cáncer en Venezuela. *Rev. venez. oncol.*, dic. 2006, vol.18, no.4, p.269-281. ISSN 0798-0582.
43. Rivera, H Nikitakis N; Correnti M, Maissi S, Ponce J. Oral and oropharyngeal cancer in venezuelan population. *AOL*. 2008, Vol 21 N° 2/ 175-180.
44. Neville, Damn, allen, Bouquot. *Oral And Maxillofacial Pathology*. 2002 Company saunders. PhiladelPhia, Pensylvania.
45. Barnes, Evenson, Reichart, Sidransky (Eds) *Wolrd Health Organization Classification Tumours. Pathologyc adn Genetics Head and Neck Tumours*.IARC Press. Lyon 2005
46. Cawson, Odell, Porter. *Cawson ´s Essentials of Oral Pathology and Oral Medicine*. 2002. El Sevier Science .
47. Ferlito A, Devaney KO, Rinaldo A, Putzi MJ (1999). Papillary squamous cell carcinoma versus verrucous squamous cell carcinoma of the head and neck. *AnnOtolRhinol Laryngol* 108: 318-322.
48. Suarez PA, Adler-Storthz K, Luna MA, El Naggat AK, Abdul-Karim FW, Batsakis JG (2000). Papillary squamous cellcarcinomas of the upper aerodigestive tract: a clinicopathologic and molecular study. *Head Neck* 22: 360-368.
49. Thompson LD, Wenig BM, Heffner DK, Gnepp DR (1999). Exophytic and papillarysquamous cell carcinomas of the larynx: clinicopathologic series of 104 cases. *Otolaryngol Head Neck Surg* 120:718-724.

50. Batsakis JG, Suarez P (2000). Papillary squamous carcinoma: will the real one please stand up? *Adv Anat Pathol* 7: 2-8
51. Lewis JE, Olsen KD, Sebo TJ (1997). Spindle cell carcinoma of the larynx: review of 26 cases including DNA content and immunohistochemistry. *Hum Pathol* 28:664-673.
52. Thompson LD, Wieneke JA, Miettinen M, Heffner DK (2002). Spindle cell (sarcomatoid) carcinomas of the larynx: a clinicopathologic study of 187 cases. *Am J Surg Pathol* 26: 153-170.
53. Brito H, Vassallo J, Altemani A (2000). Detection of human papillomavirus in laryngeal squamous dysplasia and carcinoma. An in situ hybridization and signal amplification study. *Acta Otolaryngol* 120:540-544.
54. Correnti M, Rivera H, Avila M, Ponce J, Nikitakis N. Expression of PCNA, Ki-67, P53 and p21 in oral and oropharyngeal squamous Cell Carcinoma in a Venezuelan Population.
55. Nikitakis, Rivera, Lopes, Siavash, Reynolds, Ord, Sauk. Immunohistochemical Expression of Angiogenesis-Related Markers in Oral squamous Cell carcinomas with Multiple Metastatic lymph Nodes. *Am J Clin Pathol*. 2003;113: 575-586.2008
56. Negri E, La Vecchia C, Franceschi S, Tavani A (1993). Attributable risk for oral cancer in northern Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2: 189-193.
57. Macfarlane GJ, Macfarlane TV, Lowenfels AB (1996). The influence of alcohol consumption on worldwide trends in mortality from upper aerodigestive tract cancers in men. *J Epidemiol Community Health* 50: 636-639.
58. La Vecchia C, Talamini R, Bosetti C, Negri E, Franceschi S (1999). RESPONSE: cancer of the oral cavity and pharynx in nonsmokers who drink alcohol and in nondrinkers who smoke tobacco. *J Natl Cancer Inst* 91: 1337-1338.

58. Mirbood SM, Ahing SI (2000) Tobacco-associated lesions of the oral cavity: part 1 . J Can Dent Assoc. May; 66 (5) 252-6
59. Walsh P, Epstein J. (2000) The oral effects of smokeless tobacco. J Can Dent Assoc. 66:22-5.
60. Znaor A, Brennan P, Gajalakshmi V, Mathew A, Shanta V, Varghese C, Boffetta P (2003). Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in Indian men. *Int J Cancer* 105: 681-686.
61. Idris AM, Ahmed HM, Malik MO (1995). Toombak dipping and cancer of the oral cavity in the Sudan: a case-control study. *Int J Cancer* 63: 477-480.
62. Koda K, Takiguchi N, Nunomura M, Seine K, Miyazaki M. Detection of Epstein-Barr virus in gastric carcinoma cells and surrounding lymphocytes. *Gastric Cancer*. 2003;6:173–178
63. Grinstein S, Preciado M, Gattuso P, Chabay P, Warren W, De Matteo E, et al. Demonstration of Epstein-Barr Virus in Carcinomas of Various Sites. *Cancer Res*. 2002;62:4876–4878
64. MacMahon E, Glass J, Hayward S, Mann R, Becker P, Charache P, et al. Epstein-Barr virus in AIDS related primary central nervous system lymphoma. *Lancet*. 1991;338:969–973
65. Sugawara Y, Mizugaki Y, Uchida T, Torii T, Imai S, Makuuchi M, et al. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) in hepatocellular carcinoma tissue: a novel EBV latency characterized by the absence of EBV-encoded small RNA expression. *Virology* 1999;256:196–202
66. Labrecque L, Barnes D, Fentiman I, Griffin B. Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study. *Cancer Res* 1995;55:39–45

67. Bonnet M, Guinebretiere J, Kremmer E, Grunewald V, Benhamou E, Contesso G, et al. Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1376–1381
68. Wong M, Chung L, Yuen S, Leung S, Chan S, Wang E, et al. In situ detection of Epstein-Barr virus in non-small cell lung carcinomas. *J Pathol* 1995;177:233–240
69. Han A, Xiong M, Gu Y, Lin S, Xiong M. Lymphoepithelioma like carcinoma of the lung with a better prognosis. A clinicopathologic study of 32 cases. *Am J Clin Pathol*. 2001;115: 841–850
70. Castro C, Ostrowski M, Barrios R, Green L, Popper H, Powell S, et al. Relationship between Epstein Barr virus and lymphoepithelioma like carcinoma of the lung: a clinicopathologic study of six cases and review of the literature. *Hum. Pathol*. 2001;32: 863–872
71. Samaha S, Tawfik O, Horvat R, Bhatia P. Lymphoepithelioma-Like Carcinoma of the Colon. Report of a Case with Histologic, Immunohistochemical, and Molecular Studies for Epstein-Barr Virus. *Dis Colon Rectum* 1998;41:925-928.
72. Chen P, Pan C, Hsu W, Ka H, Yang A. Epstein-Barr Virus-associated lymphoepithelioma-like carcinoma of the esophagus. *Hum Pathol*. 2003;34:407-410
73. Jeng Y, Chen C, Hsu H. Lymphoepithelioma-Like Cholangiocarcinoma. An Epstein-Barr Virus-Associated Tumor. *Am J Surg Pathol*. 2001;25(4): 516–520.
74. Consenso sobre Carcinoma Basocelular y Carcinoma Espinocelular, guia de Recomendaciones. Sociedad Argentina de Dermatología. 2005

