UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESCUELA DE POSGRADO

"DETECCIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN LESIONES PRECANCEROSAS Y CANCEROSAS DE LA MUCOSA BUCAL: EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DIAGNÓSTICOS Y DE TÉCNICAS DE OBTENCIÓN DEL MATERIAL. ASOCIACIÓN DE LOS RESULTADOS CON OTROS FACTORES CARCINOGÉNICOS"

TESISTA:

OD. MÓNICA BEATRIZ BENÍTEZ

DIRECTOR:

DR. PROF. HÉCTOR LANFRANCHI TIZEIRA

CÓRDOBA, 2008

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

TITULO DEL TRABAJO

Detección del Virus del Papiloma Humano en lesiones precancerosas y cancerosas de la mucosa bucal: Evaluación de diferentes métodos diagnósticos y de técnicas de obtención del material. Asociación de los resultados con otros factores carcinogénicos.

“Trabajo de tesis para optar al Título de Doctor en Odontología".

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Prof. Héctor Lanfranchi Tizeira.

DOCTORANDO

Od. Mónica Beatriz Benítez.

2008

A mis padres

Nita y Cumi.

... y hoy más que nunca recuerdo la máxima que repitieron incansablemente:

“Estudia y no serás cuando crecido, el juguete vulgar de las pasiones ni el esclavo servil de los tiranos”.

Agradecimientos:

A mis hijos Joaquín y Catalina, por tolerar a esta mamá “tesista” que en este último año se comportó de modo tal que mereció el apodo de “Rain man” en alusión al inolvidable personaje compuesto por Dustin Hoffman en aquella memorable película.

A mi compañero Alberto que, desde tan lejos, estuvo pendiente de mis avances y de mis dificultades, brindándome apoyo con su amor incondicional.

A mi padre y a mi madre, porque son ejemplos de honestidad, solidaridad, compromiso, coherencia, voluntad, constancia y dedicación.

A mis pacientes, por su confianza y su entrega.

A mis amigas Carmen Visvisián, Cristina Saidman, Luisa Mateos, Marisa Viola, Ana Aiassa, Mirtha D´Agosto, Gladys Díaz por el acompañamiento en el maravilloso camino de la vida y de nuevo a “mamá” Carmen por su insistencia y su empuje y a Sonia Julián por su entusiasmo.

A mis amigas y compañeras de Cátedra, Silvia Hernández, Paola Belardinelli y Rosana Morelatto por su colaboración en la obtención de las muestras de este trabajo y por su permanente y generosa disposición.

A mi compañera del secundario Prof. Dra. Marta Susana Furnes por su desinteresada colaboración en este trabajo de investigación y por sus informales clases de histología entre mates y otras charlas.

Al Prof. Dr. Julio Díaz, eximio estomatólogo, por habernos enseñado a reconocer, ya hace años, las manifestaciones clínicas sospechosas de infección por Virus del Papiloma Humano.

Al Prof. Dr. Hector Lanfranchi por haberme alentado a realizar este trabajo en aquellos difíciles momentos de mi vida en los que yo no me tenía confianza.

A la Prof. de la Cátedra de Estomatología “B”, Dra. Silvia López de Blanc por permitirme realizar este trabajo en la cátedra bajo su dirección y poner a mi disposición el material necesario, y a todo el personal de la misma por hacerlo posible gracias a la silenciosa tarea diaria.

A las Doctoras Nidia Modesti y Viviana Furrer, investigadoras del CE. PRO. COR, por el procesamiento del material estomatológico y la realización de las técnicas de identificación y tipificación del DNA Viral, así como por su invalorable asesoramiento científico.

A la Dra. Mabel Brunotto por su valioso aporte en el análisis estadístico, por su inconmensurable paciencia para aclarar mis dudas y por su desinteresada colaboración en la revisión de los resultados.

A los miembros de Tribunal de tesis: Doctores Marta Crossa, Fabián Femopase y José Luis Bocco, por el interés manifestado, por los valiosos consejos, y por el cordial acompañamiento en este trabajo de tesis.

A la Facultad de Odontología y a sus autoridades por haber posibilitado mi formación y por brindarme la posibilidad de crecer en la profesión.

A la secretaria de la Escuela de Graduados, Sra. Liliana Dajruch, por su excelente disposición para salvar los inconvenientes que se presentaren.

A los integrantes de la Comisión de Doctorado: Prof. Dr. Jorge Uribe Echevarría, Dra Alfonsina de Ferrer, Dr. Quiroga por facilitar la tarea y allanar el camino.

A la Sta. Tamara Cortez de la Biblioteca de la Facultad de Odontología y a las Señoras María del Mar y Laura de la Biblioteca del Hospital Privado por el asesoramiento en la búsqueda bibliográfica.

A Guadalupe Pousa por su ayuda en el diseño gráfico del manuscrito y de la presentación.

Indice

ABREVIATURAS 6

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN 8
1.1 Cáncer: generalidades 9
1.1.1 Características de las células maligna 11
Fig. 1 12
1.1.2 Estadificación de la enfermedad tumoral 13
Tabla 1 13
Tabla 2 14
1.2 Epidemiología 14
1.3 Ciclo celular y sus factores de regulación 16
1.3.1 Ciclo celular 16
1.3.2 Fases del ciclo celular 16
Fig. 2 17
1.3.3 Bioquímica del ciclo celular 18
1.3.4 Transformación y “checkpoints” 19
1.4 Transformación celular y tumorigénesis 20
1.4.1 Carcinogénesis 22
Fig. 3 23
Fig. 4 24
1.4.1.1 Agentes cancerígenos iniciadores y promotores 24
1.4.2 Evolución genética y molecular del cáncer oral 26
1.4.2.1 Teoría de la cancerización del campo 29
1.4.2.2 Aberraciones cromosómicas comunes 30
Fig. 5. 31
1.4.2.3 Protooncogenes, oncogenes y genes supresores de tumores 31
Fig. 6. 33
1.4.2.4 Factores de crecimiento 35
1.4.2.5 Angiogénesis 35
1.4.2.6 Metaloproteinasas 36
Fig. 7 37
1.5 Factores de riesgo 37
1.5.1Tabaco 38
1.5.2 Alcohol 39
1.5.3 Irritación mecánica 39

1.5.4 Infección con cándida 40
1.5.5 Infección con virus 41
1.5.5.1 Oncogénesis viral 42
1.5.5.2 Biología viral 43
1.5.5.3 Mecanismos patogénicos comunes a los virus ooncogénicos a ARN 45
1.5.5.4 Mecanismos patogénicos comunes a los virus oncogénicos a ADN 45
Fig. 8 46
1.5.5.5 Consideraciones básicas sobre algunos virus oncogénicos Humanos..... 46
Fig. 9 50
Tabla 3 50
a) Expresión del genoma viral: 51
Fig. 10 52
b) Patogénesis y patología 53
c) HPV y Cáncer 54
d) Respuesta inmune 55
e) Latencia y persistencia 55
f) Clínica e histología 56
Tabla 4 58
g) Métodos convencionales para el diagnóstico de la infección por HPV 58
g.1 Observación clínica 59
g.2 Citología e histología 59
g.3 Pruebas serológicas 59
g.4 Métodos de detección del DNA del HPV 59
g.4.1 Aislamiento del material genético y enzimas de restricción 60
g.4.2 Hibridización; reacciones 60
g.4.2.1 Reacciones de hibridización 62
g.4.2.1 Hibridización in situ 63
g.4.2.2 Dot blot 63
g.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa 64
Fig. 11 65
. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 66
. OBJETIVOS 67
. HIPÓTESIS 68

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS 69
2.1 Población bajo estudio. 70
Fig. 12 70
2.2 Criterios clínicos diagnósticos 72
a) Infección con HPVs. 72
Fig. 13 72
b) Infección con cándida 73
Fig. 14 73
c) Microtraumatismos crónicos. 73
Fig. 15 74
2.3 Citología Exfoliativa y Biopsia 74
2.4 Análisis Citológico e Histopatológico 75
Fig. 16 75
2.5 Aislamiento de DNA 76
2.6 PCR del genoma de HPV 76
2.7 Southern Blot 77
2.8 PCR del gen de la β-globina 77
2.9 Cuantificación del DNA 78
2.10 Análisis Estadísticos 78
Tabla 5 79

CAPÍTULO III

RESULTADOS 80
3.1 Características de la población estudiada. 81
Fig. 17 82
Fig. 18 84
Fig. 20 84
3.2.1 Métodos de recolección de las muestras: Citología versus biopsia. 84
Fig. 21 85
Tabla 6 86
Fig. 22 87
Fig. 23 88
3.2.2 Prevalencia de los distintos genotipos de HPV 88
Fig. 24 89
Tabla 7 90
Fig. 25 91
Fig. 26 92

Fig. 27 93
Fig. 28 94
3.3 Correlación de la presunción clínica e histológica de infección con HPVs con los resultados obtenidos por PCR– Southern blot. 95
Tabla 8 96
Tabla 9 96
Fig. 29 97
3.4 Correlación de la infección con HPV y otros factores co-carcinogénicos 97
Tabla 10 98
Fig. 30 98
Fig. 31 99
Fig. 32 100

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN 103
CONCLUSIONES 120

RESUMEN 122
ABSTRACT 123
BIBLIOGRAFÍA 124
DIFUSIÓN DE RESULTADOS PARCIALES 125
PUBLICACIONES (ORIGINALES) 126

Abreviaturas

Ac: acantosis.

Ac Q: acantosis, queratosis.

Ac Vg Vr: acantosis, vegetación, verrugosidad.

ADN: ácido desoxirribonucleico, en inglés DNA.

ARN: ácido ribonucleico, en inglés RNA.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

Cdk: quinasas dependientes de ciclinas.

CE: carcinoma espinocelular.

C-onc: oncogenes celulares.

CIS: carcinoma in situ.

CEM: carcinoma espinocelular microinvasor.

CEI: carcinoma espinocelular invasor.

CE lesión: citología exfoliativa de la lesión.

CE lado sano: citología exfoliativa del lado sano.

col.: colaboradores.

CV: carcinoma verrugoso.

Chi-Cuad : prueba del chi cuadrado.

Diagn: diagnóstico.

DNA-HPV: ácido desoxirribonucleico del virus del papiloma humano.

EV: Epidermodisplasia Verruciforme.

E: región temprana.

EBV: Virus de Epstein- Barr.

EDTA: ácido dietil amino tetra acético.

EGF: epidermal growth factor o factor del crecimiento epidérmico.

EGFR: epidermal growth factor receptor o receptor del factor del crecimiento epidérmico.

etc.: etcétera.

GF: growth factor o factor de crecimiento.

H: homogénea

Ho: hipótesis nula

HBV: Virus de la Hepatitis B Humana.

HC: historia clínica

HHV-8: Virus del Herpes Humano 8.

HIV: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

HPV: Human papilloma virus o virus del papiloma humano, plural **HPVs**.

HTLV: Human T Lymphocyte virus o virus del linfocito T humano.

IARC: International Agency for Research on Cancer o Agencia Internacional para Investigación del Cáncer.

ICD: Internacional Classification of Diseases o Clasificación Internacional de las Enfermedades.

L: región tardía.

LCR: región reguladora.

LPV: leucoplasia proliferativa verrugosa.

mM: mili mol.

ng: nanogramo.

NH: no homogéneas.

OMS: Organización Mundial de la Salud en inglés WHO.

OR: odds ratio.

ORFs: open reading frames o marcos abiertos de lectura.

p_biop: PCR en biopsia.

p_coil: coilocitos.

p_cl: presunción clínica.

P.Histológ: presunción histológica.

PCR: polymerase chain reaction o reacción en cadena de la polimerasa

pg.: Picogramos.

Q: queratosis.

PM: peso molecular.

RCP: región de codificación proteica.

rpm : revoluciones por minuto.

v- onc: oncogenes virales.

μg: microgramo.

μM: micro mol.

Vg: vegetación.

Vr: verrugosidad.

Capítulo I

Introducción

1.1 Cáncer: Generalidades.

Los cánceres resultan de la multiplicación descontrolada de una célula o grupo de células del organismo, También se denomina tumor o neoplasia maligna. La peculiaridad específica de la malignidad consiste en la capacidad para invadir y destruir tejidos sanos de su entorno, proceso que denominamos infiltración, y de enviar células a zonas distantes del organismo, donde pueden anidar o crecer originando nuevos tumores denominados metástasis.

En el año 2000, el cáncer de cabeza y cuello se ubicó entre las 8 principales causas de muerte a nivel mundial. Se desarrollaron aproximadamente 481.000 casos nuevos y 320.000 personas murieron a causa de dicha enfermedad. La tasa de incidencia promedio fue de 8,8 y 5,1 cada 100 mil y de 7,3 y 3,2 cada 100 mil la tasa de mortalidad promedio en hombres y mujeres respectivamente (1).

El cáncer bucal es un problema importante de la salud, especialmente en los países subdesarrollados y es uno de los diez tumores más frecuentes a nivel mundial; según Globocan 2002 (2) hubo 274.289 casos nuevos con tasas de incidencia de 5,6 y 3,2 y murieron 127.099 personas, resultando una tasa de mortalidad de 2,6 y 1,5 para el sexo masculino y femenino respectivamente.

La Organización Mundial de la Salud, OMS, predice un aumento mundial en el número de pacientes con cáncer bucal en las próximas décadas. Constituye un subgrupo de las neoplasias malignas de cabeza y cuello que se desarrolla en los labios, la lengua, la encía, el piso de boca, la orofaringe, la mucosa yugal, y el paladar de acuerdo a la Clasificación Internacional de las Enfermedades (ICD versión 9, categoría: 140-146, 149).Sin embargo, el término es sinónimo de **carcinoma espinocelular (CE)** de la mucosa bucal ya que constituye más del 90% de todas las lesiones malignas que se presentan en los sitios antes mencionados (3).

La incidencia del cáncer oral tiene variación local significativa y está aumentando de algunas partes del mundo. En la India y otros países asiáticos, los carcinomas orales y orofaríngeos abarcan hasta la mitad de todas las malignidades siendo este predominio particularmente alto atribuido a la influencia de agentes carcinógenos y a factores epidemiológicos específicos de la región (4).

El desarrollo de un proceso maligno en el epitelio plano estratificado tiene lugar espontáneamente o como un proceso gradual en el cual múltiples alteraciones menores individuales de células y tejidos culminan finalmente en clara malignidad. La combinación de cambios tisulares observados en la transición gradual hacia la malignidad se denomina displasia epitelial. La forma más grave de la misma que afecta la totalidad del espesor del epitelio es el **carcinoma *in situ* o CIS**. Citológicamente es similar al CE salvo desde un punto de vista arquitectónico ya que la membrana basal permanece intacta y no ha tenido una invasión del tejido conjuntivo. Cuando las células epiteliales displásica rompen la membrana basal e invaden el tejido conectivo, haciendo posible que se produzcan metástasis a distancia, el CIS se convierte en **carcinoma epidermoide o espinocelular**. En una primera etapa se localiza en el corion superficial, **CE microinvasor,** para luego avanzar en profundidad, **CE invasor,** pudiendo erosionar los vasos linfáticos y sanguíneos, haciendo posible su transporte a distancia, **metástasis.** **Fig. 1.**

Aunque todos los carcinomas tienen alguna capacidad de metastatizar, hay una gran diversidad en el potencial metastático en cierta medida relacionado con la variedad histológica que a su vez depende del grado de diferenciación que presentan las células tumorales y la similitud entre la arquitectura del tejido tumoral y la del normal. Los tumores que producen queratina y presentan algunos rasgos de maduración desde las células basales a las superficiales se consideran **bien diferenciados**, los que producen escasa o nula queratina pero en los que se reconoce todavía la estructura del epitelio plano estratificado son los **moderadamente o semi-diferenciados** y los que no producen queratina, tiene poco parecido a un epitelio plano estratificado, muestran una significativa falta del patrón estructural normal y de cohesión de las células que presentan extensas anormalidades, se denominan **poco diferenciados o indiferenciados**.

El **CE** de la mucosa bucal se presenta clínicamente como una úlcera indurada, como un tumor o como vegetaciones y verrugosidades o algunas de estas manifestaciones combinadas (5).

Una entidad clínica patológica distinta entre los carcinomas orales es el **carcinoma verrugoso CV** primero descrito en 1948 por Ackerman (6). También se lo denomina **papilomatosis oral florida** (7) y aunque puede

presentarse en otras localizaciones anatómicas es más frecuente en la cavidad bucal**.** Es un carcinoma de bajo grado de malignidad. Suele ser agresivo y terebrante destruyendo localmente y, sin embargo, no da metástasis viscerales y solamente en el 10% de los casos da metástasis regionales. Clínicamente se manifiesta como vegetaciones o verrugosidades pero translúcidas y brillantes. Histológicamente se presenta inicialmente con leucoedema, acantosis y papilomatosis, luego con invaginaciones del epitelio que determinan criptas profundas que contienen tapones de paraqueratina. El epitelio puede presentar aspecto de CIS o de CE pero la membrana basal está conservada. En algunos casos los CV pueden transformarse en CE (8).

1.1.1 Características de las células malignas.

Las células cancerosas resultan de la disrupción en los circuitos que regulan la proliferación y homeostasis de las células normales.

Las células malignas tienen características diferentes de su contraparte normal de la que provienen (9,10):

- Pueden sortear las situaciones de muerte celular programada o apoptosis.
- Pueden permanecer por tiempo indeterminado en subcultivos in vitro o transplantarse de un hospedador apropiado a otro.
- Pierden total o parcialmente la capacidad de madurar y así logran vivir mucho más tiempo.
- Requieren menos concentraciones séricas para su crecimiento.
- No necesitan fijarse a ningún sustrato.
- Están menos sometidas a la inhibición del crecimiento dependiente de la densidad.
- Son capaces de sortear o evitar los límites de restricción del ciclo celular.
- Pueden replicar fuera del control de los factores de crecimiento que regulan la comunicación intercelular normal dando lugar a un crecimiento celular anárquico.
- Pueden dividirse en ausencia de sustancias mitogénicas.
- Pierden la inhibición por contacto, por lo que su crecimiento es en forma de masas desordenadas de células en capas múltiples.

En el crecimiento celular in vivo, las células pueden presentar varios patrones de diferenciación celular constituyendo los tumores “diferenciados”, “semidiferenciados”, o “indiferenciados”.

Las células cancerosas destruyen los tejidos que las circundan invadiéndolos o infiltrándolos. Son varios los factores causantes de la **invasión / infiltración:**

- La presión física que ejerce el tumor sobre los tejidos circundantes.
- La disminución de la adhesividad y cohesividad de las células tumorales.
- El aumento de la movilidad celular.
- La pérdida de la inhibición por contacto.
- La liberación de enzimas destructoras: colagenasas, hidrolasas lisosómicas, y activador del plasminógeno.

Además, las células malignas tienen la capacidad de migrar hacia otros sitios y, una vez instaladas en algún tejido que les ofrezca las condiciones propicias, establecer una nueva colonia de células, formándose así un nuevo tumor que constituye la **metástasis.** La colonización por células cancerosas puede darse por:

- La implantación en cavidades corporales.
- La diseminación linfática, característica de los carcinomas, ocurre cuando las células malignas encuentran un vaso linfático, migran hacia su luz a través de las uniones endoteliales y una vez allí viajan hasta cualquier lugar irrigado por este sistema.
- La diseminación hematógena, típica de los sarcomas, se produce a través del sistema venoso en una secuencia similar a la anteriormente explicada.
- La movilización de células malignas en un acto quirúrgico.

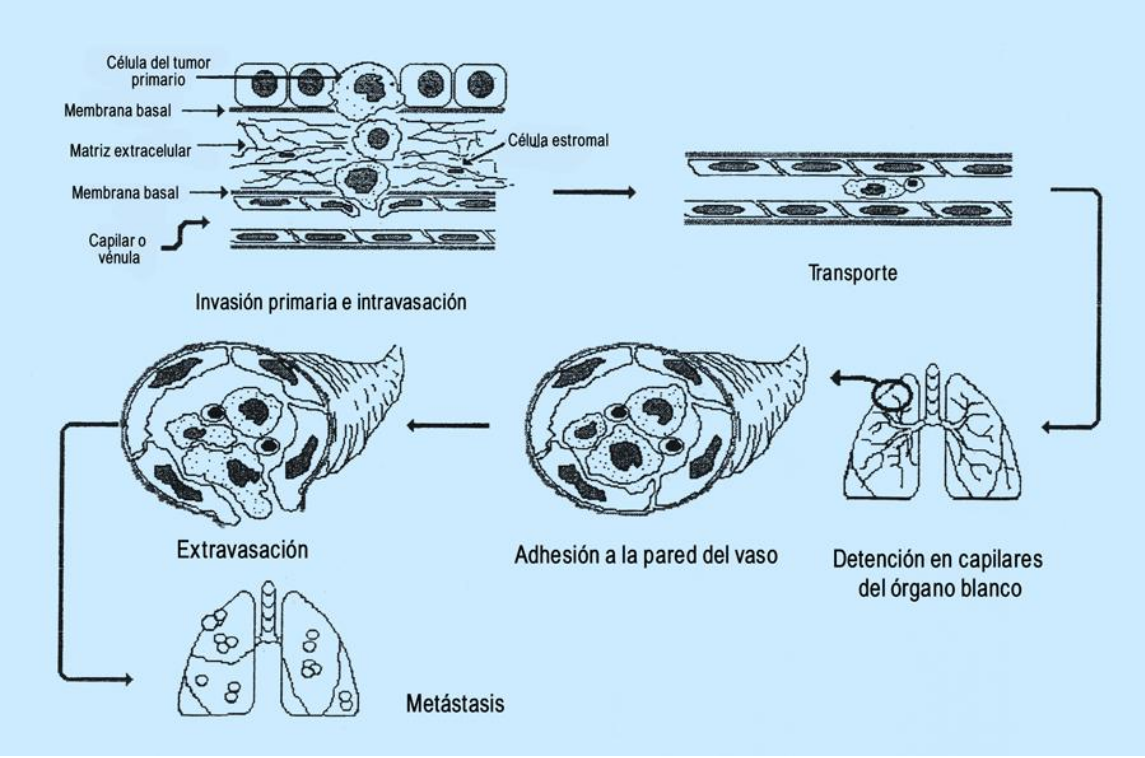


Fig.1: Representación esquemática de la diseminación de las células malignas desde su su localización inicial hasta la colonización en órganos distantes. Modificado de Bases de Oncología Molecular de Bonfil D, Scharovsky G y col. Ediciones Dunken. 1998.

1.1.2 Estadificación de la enfermedad tumoral.

El estadio del CE permitirá que el clínico determine el pronóstico basado en los criterios de estadificación que incluyen el tamaño del tumor, y el grado de la extensión metastásica de la lesión primaria. La estadificación implica la cuantificación clínica de distintos parámetros: el tamaño del tumor primario, (la etapa de T), la presencia o la ausencia de complicación regional del ganglio linfático (etapa de N), y presencia o ausencia de las metástasis distantes (etapa de M). Mientras que hay variaciones publicadas del sistema del estadificación, el TNM es el sistema más extensamente aceptado y con altos índices de correlación conocidos entre el nivel de la etapa y la tasa de supervivencia a los 5 años. La Tabla I define los criterios para el sistema de TNM mientras que la tabla II delinea las categorías clínicas de estadificación y los índices correspondientes de supervivencia a los 5 años del CE de la cavidad bucal. Además del papel universalmente aceptado del sistema TNM en relación a la supervivencia, factores adicionales como el tamaño del tumor, el grado de diferenciación y la invasión vascular y perineural son muy importantes (11,12).

Tabla 1: Tumor-nódulo linfático-metástasis (TNM). Sistema de estadificación del carcinoma bucal (13).

Tumor Primario: tamaño (T)
TX No hay información del tumor primario.
TO No hay evidencia del tumor primario.
TIS Sólo carcinoma in situ.
T1 Tumor menor a 2cm en su mayor diámetro.
T2 Tumor es de 2 a 4cm en su mayor diámetro.
T3 Tumor de más de 4cm en su mayor diámetro.
T4 Tumor de más de 4cm de diámetro con compromiso del seno maxilar, los músculos pterigoideos, la base de la lengua, o la piel.
Compromiso de los ganglios linfáticos (N)
NX Los ganglios no pudieron ser determinados.
NO No se encontraron ganglios positivos en el examen clínico.
N1 Sólo un ganglio homolateral clínicamente positivo de menos de 3cm de diámetro.
N2 Sólo un ganglio homolateral clínicamente positivo de 3 a 6cm de diámetro o múltiples ganglios. homolaterales clínicamente positivos, ninguno de más de 6cm de diámetro.
N2a Sólo un ganglio homolateral clínicamente positivo de 3 a 6cm de diámetro.
N2b Múltiples ganglios homolaterales clínicamente positivos, ninguno de más de 6cm de diámetro.
N3 Ganglio(s) homolateral en masa, o ganglio(s) bilateral, o ganglio (s) contra lateral.
N3a Ganglio(s) homolateral clínicamente positivos, uno de más de 6cm de diámetro.
N3b Ganglio(s) bilaterales clínicamente positivos.
N3c Ganglio(s) contralaterales clínicamente positivos.
Metástasis a distancia (M)
MX No se determinó metástasis a distancia.
MO No hay evidencia de metástasis a distancia.
M1 Hay metástasis a distancia.

Tabla 2: Tumor-nódulo linfático-metástasis (TNM). Sistema de estadificación del carcinoma bucal.

Promedio de sobrevida a los 5 años (%)	
Estadío I: T1NOMO	85
Estadío II: T2NOMO	66
Estadío III: T3NOMO, o T1, T2, o T3, N1MO	41
Estadío IV: T4, o cualquier N2 o N3 o M1	9

1.2 Epidemiología.

A nivel mundial, en la década pasada, la mortalidad por tumores malignos figuró entre las cuatro primeras causas de muerte junto con las enfermedades cardíacas, las cerebro-vasculares y los accidentes. El cáncer bucal representa entre el 2 al 5% del total de los cánceres de todo el organismo, constituyéndose en uno de los diez cánceres más frecuentes (14) y el 90% de estos tumores malignos son carcinomas espinocelulares (15).

Con respecto a su incidencia mundial, ocupa el octavo lugar por detrás de los cánceres de pulmón, colon, recto, mama y próstata entre otros. La OMS ha informado recientemente un aumento en la incidencia del cáncer en todo el organismo, inclusive del cáncer de boca (16) encontrándose marcadas diferencias geográficas en relación a las variaciones locales de los factores de riesgo (17). Así es que en los EEUU es del 2 al 4% de los cánceres diagnosticados siendo el responsable de 8.000 muertes cada año. En algunos países europeos del oeste – Bélgica, Dinamarca, Grecia, Portugal y Escocia – hubo un llamativo incremento en la incidencia de carcinomas orales (18) y, comparando los períodos 1955-1959 y 1990-1992, se observó un aumento en las tasas de mortalidad para individuos de ambos sexos entre los 35 y 64 años (19). La tasa de mortalidad aumentó para los varones en casi todos los países, variando entre un 16% (Inglaterra y Gales) a más de 400% (Checoslovaquia, Alemania, Hungría, Polonia, Rumania, España, Yugoslavia).

En nuestra provincia, según un estudio realizado por Morellato y col. (20), se ha observado un incremento del 6% en las tasas de mortalidad ocasionadas por tumores de todo el organismo en la última década con respecto al período 1975-1984; mientras que la tasa de mortalidad por tumores bucales aumentó un 60% en el mismo período.

La tasa de supervivencia a los cinco años para cáncer bucal es de aproximadamente el 50% y varía entre 20 a 80% de acuerdo a la localización y al tamaño del tumor, a su grado de diferenciación y a la presencia de metástasis regionales y a distancia (21-23).

En nuestro país, en un estudio realizado por la Cátedra de Clínica Estomatológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires, se observó en los pacientes con cáncer de boca que a los 5 años la sobrevida es del 37% llegando sólo al 27% cuando el tumor se ubica en la lengua y al 19% cuando asienta en piso de boca, siendo en esta última localización comparable a la del melanoma (24).

Algunos autores sostienen que el cáncer de boca tiene una sobrevida menor que la de otros cánceres tales como los de próstata, cuello de útero, mamas, pulmón o colon (25).

Según González García R y colaboradores (26), el pronóstico del cáncer de boca es semejante al del melanoma oral, considerado como uno de los cánceres más malignos.

El carcinoma espinocelular tiene una mortalidad y una morbilidad significativa (15, 27, 28).

A pesar de los avances en el tratamiento del cáncer en las últimas décadas no pareciera haber modificaciones sustanciales en la sobrevida de estos pacientes (21). El motivo de esta situación obedecería a que más de la mitad de los cánceres de boca se diagnostican en estadios avanzados (22, 24, 29).

Sin embargo, la realidad es otra cuando se realiza la detección, el diagnóstico y en consecuencia el tratamiento del cáncer bucal en estadios iniciales lográndose una sobrevida del 50 a 80%. Por el contrario en los estadios avanzados, con un tamaño del tumor mayor a 4 cm. y/o con metástasis regionales o a distancia, la sobrevida se reduce del 50% a tan sólo el 20 % (22, 24, 29- 32).

Se atribuye el diagnóstico tardío a la demora del paciente en realizar la primera consulta y del profesional en establecer un diagnóstico de certeza (33-35).

Esta demora en el tratamiento ocasiona una elevada morbilidad asociada al mismo ya que mientras más avanzada es la enfermedad más agresivo es el tratamiento dejando secuelas que, con frecuencia, alteran la estética y la función favoreciendo el aislamiento social y llevando, en consecuencia, a un severo deterioro en la calidad de vida.

Antes de introducir las hipótesis del presente trabajo de investigación parece conveniente resumir algunos conceptos actuales sobre el ciclo celular y sus factores de regulación así como acerca de la tumorigénesis en general y la carcinogénesis en particular, sus mecanismos de producción y los factores involucrados en su iniciación, desarrollo y mantenimiento.

1.3 Ciclo celular y sus factores de regulación.

1.3.1 Ciclo celular

Los organismos multicelulares pueden ser pensados como cooperativas dirigidas a un fin común: el crecimiento y la reproducción. Las células, especializadas en diferentes funciones, crecen y se dividen en complejos

patrones arquitectónicos denominados órganos y se comunican entre ellas a través de señales químicas y eléctricas.

A pesar de estos complicados patrones de interdependencia, las células pueden considerarse autónomas: presentan un ciclo vital en donde crecen y se dividen en forma independiente. En la práctica, los organismos multicelulares regulan ese ciclo vital individual acorde a un estricto código de “reglas sociales” de división. La violación de este código de división celular lleva a la aparición del cáncer y, en definitiva, puede devenir en la muerte del organismo.

Se denomina ciclo celular a la serie de eventos que tiene como finalidad la proliferación. En cada ciclo las células crecen, replican su ADN, segregan sus cromosomas en dos grupos idénticos y se dividen en dos células hijas. Este proceso debe ser realizado con extrema precisión ya que se replicará la compleja estructura cromosomal en donde se encuentra almacenada la información genética. Cualquier alteración grave de este proceso impedirá que las células replicadas puedan cumplir con su función normal.

1.3.2 Fases del ciclo celular

El ciclo celular está compuesto por diferentes fases: G_0, G_1, S, G_2 y M. El concepto de fases apareció al descubrir que la replicación nuclear y la división nuclear ocurrían en momentos distintos. El ciclo celular, definido por estas reacciones que tienen lugar en el núcleo, pudo dividirse en fase S, en la que se duplica la estructura cromosomal, y fase M, en donde se produce la segregación nuclear y la división celular **Fig. 2.**

Entre S y M se encuentran las fases G_1 y G_2 (del inglés Gap: espacio), en las que la célula comprueba que la fase anterior se haya completado sin errores y se prepara para la siguiente. Después de la mitosis, las células diferenciadas entran con frecuencia en un estado de reposo denominado G_0. La iniciación de cada fase dependerá de la terminación de la fase anterior.

El ciclo celular está controlado por factores extra e intracelulares. Así, los factores extracelulares determinan si una célula en G_0 comenzará a proliferar y si una célula normal G_1 continuará proliferando o revertirá a G_0. Al entrar en fase S, en cambio, los eventos del ciclo celular se hacen independientes de los factores externos y la regulación de las fases de segregación nuclear y división celular dependerá de controles internos.

En resumen:

Fase G_0: es la etapa de reposo celular.

Fase G_1: es el periodo que hay entre las fases M y S. En G_1, la célula elabora todos los elementos que van a ser utilizados durante la fases S (enzimas, nucleótidos e histonas).

Fase S: es la etapa en la que se replica toda la estructura cromosomal (ADN e histonas) y los centríolos.

Fase G_2: es el periodo que hay entre las fases S y M. La célula sintetiza todos los componentes del aparato mitótico, chequea si el ADN se ha replicado en forma correcta durante la fase S y repara sus alteraciones topológicas a través de la enzima **topoisómerasa II**.

Mitosis: es el proceso celular a través del cual se asegura la equipartición de cromosomas en el proceso de segregación nuclear y división celular (36).

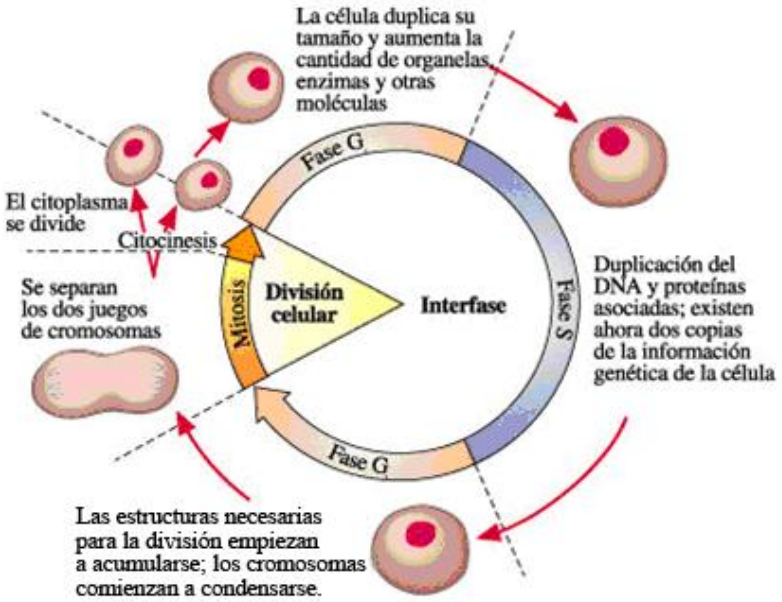


Fig.2: Ciclo celular: se divide en fase S, en la que se duplica la estructura cromosomal, y fase M en donde se produce la segregación nuclear y la división celular. Entre éstas, las fases G_1 y G_2, en las que la célula comprueba que la fase anterior se haya completado sin errores y se prepara para la siguiente.

1.3.3 Bioquímica del ciclo celular

El pasaje de una fase del ciclo celular a otra, se halla regido por acciones bioquímicas que, a su vez, están reguladas por factores activadores y supresores.

A) Activadores del ciclo celular: entre ellos se hallan las **quinasas dependientes de ciclinas** (**cdk**). El nivel de expresión de esas enzimas es estable a través del ciclo celular. Las cdk no actúan en forma aislada, sino que su función está gobernada por proteínas denominadas **ciclinas**, que actúan como subunidades reguladoras. Las ciclinas, cuyo nivel de expresión varía a través del ciclo celular, se asocian a las cdk formando los **complejos cdk-ciclinas**, que presentan actividad quinasa agregando grupos fosfato a la proteína blanco. La adición de grupos fosfato a una determinada proteína *target* altera su función.

La síntesis de ciclinas es necesaria para la activación de las cdk. Ante determinados estímulos externos, tales como factores de crecimiento, o estímulos internos apropiados, se produce un aumento en la producción de ciclinas que favorece la formación de complejos de cdk-ciclinas. Esos complejos son activadores esenciales para la progresión a través del ciclo celular.

B) Factores supresores: inhiben el pasaje de una fase del ciclo celular a otra y favorecen a la detención de la proliferación de la célula. Se ponen en juego cuando se detectan daños que comprometen la fidelidad genética que puedan llegar a favorecer la aparición de células con alto grado de inestabilidad y con capacidad de transformarse en neoplásicas, actuando entonces como controles negativos. Su actividad produce la reparación del ADN o la muerte celular por apoptosis. Su acción, en general, se lleva a cabo inhibiendo la actividad quinasa de los complejos cdk-ciclinas.

La proteína codificada por el gen *p53* se comporta como un factor de transcripción tetramérico que se une a sitios específicos del ADN y facilita la expresión de un gen. Juega un rol central en la prevención de la transformación neoplásica. Su función es coordinar la respuesta ante la presencia de daño de ADN. En este caso, p53 detiene el ciclo celular y pone en marcha la maquinaria necesaria para la reparación de ADN.

Si el daño genético es reparado, la célula progresa a la siguiente fase. En caso contrario, p53 induce la muerte celular por apoptosis al interactuar con otras moléculas como, por ejemplo, los miembros de la familia bcl-2, éstos son oncogenes que tienen propiedades anti-apoptóticas. (37).

1.3.4 Transformación y "checkpoints".

Las células normales sufren alteraciones que resultan en inestabilidad génica y aceleran su transformación a células neoplásicas. La acumulación de daños cromosómicos por exposición a factores carcinogénicos y por una capacidad de reparación disminuida, favorecen esta transformación. Además, esta evolución es facilitada por pérdida de fidelidad en el proceso que replica, repara y segrega el genoma. Dichos daños genéticos surgen por un mecanismo de círculo vicioso en donde la aparición de múltiples alteraciones cromosómicas favorece la inestabilidad genética que va a dar origen a nuevas alteraciones. La célula defiende su fidelidad genética a través de **checkpoints** (puntos de control) y caminos de reparación que tienden a supervisar la replicación y segregación de los cromosomas.

Los **checkpoints** son posiciones de control que aseguran un orden en los eventos de duplicación celular. La detención de la proliferación celular se produce en circunstancias en donde la integridad del genoma se ve comprometida y existe la posibilidad de que las células altamente alteradas puedan progresar y propagar dichas alteraciones.

Los **checkpoints** vigilan el desarrollo de cada fase del ciclo celular a través de la coordinación activa de genes y proteínas que participan en la replicación y reparación de ADN y en la separación cromosómica, no permitiendo la progresión sin la correcta terminación de la fase anterior.

Tres componentes fundamentales en el ciclo celular están bajo vigilancia: replicación de ADN, replicación de centríolos y formación del huso mitótico. Los defectos en la vigilancia de la replicación de ADN son responsables de la aparición de aberraciones cromosómicas (deleciones, translocaciones, inversiones, mutaciones o amplificaciones): los defectos en la replicación de los centríolos o en la formación del huso mitótico llevan a errores en la migración o disyunción mitótica con una ganancia o pérdida de cromosomas (aneuploidía). Los sitios de *checkpoint* están localizados en las fases G_1 y G_2.

Checkpoint G_1: controla la entrada a la fase S. Previene que la célula duplique ADN dañado y asegura que los procesos de replicación y segregación celular se realicen sin ninguna perturbación. Previene la amplificación genética y repara las alteraciones producidas por agentes genotóxicos.

El primer mecanismo de control se da en G_1 temprana, donde se detiene el crecimiento celular si no están dadas las condiciones externas necesarias para una correcta división celular. Esta situación estaría representada por deficiencias nutricionales o déficit de factores de crecimiento.

El segundo mecanismo de control está coordinado por la acción de *p53*. Este mecanismo brinda protección celular reparando el ADN dañado o bien impidiendo la supervivencia inadecuada de células dañadas genéticamente. El aumento de proteína *p53* induce la detención temporaria del ciclo celular a través de la inducción del gen *p21* y su producto, que inhibe la formación de los complejos cdk-ciclinas. Si el daño genético logra ser reparado, la célula progresa a fase S. Si por el contrario, no logra a ser reparado, se activan los mecanismos de apoptosis celular.

La función de *p53* puede verse alterada por factores intrínsecos, como mutaciones del gen *p53*, que producen una proteína defectuosa para actuar como factor de transcripción. También puede deberse a la presencia de factores como las proteínas E1A adenoviral o E6 (papilomavirus) que se unen al p53 y lo inactivan. Si hay daño genético y p53 está alterado o inhibido, no hay detección en G_1, el ADN no es reparado, y la célula dañada progresa a fase S. Por lo tanto, este daño en el ADN se va a replicar y a transmitir a las células hijas. Esto explicaría la correlación entre neoplasias y alteraciones del p53.

Checkpoint G_2: previene la segregación cromosómica si hay daño o replicación incompleta del ADN. Además controla la formación del huso mitótico y la correcta segregación de los cromosomas durante la mitosis, impidiendo la aparición de aneuploidía y poliploidía (35).

1.4 Transformación celular y tumorigénesis

Desde el momento en que una noxa actúa sobre una célula hasta que ésta se transforma en neoplásica ocurren una serie de eventos moleculares. En general, esos cambios pueden ser definidos como alteraciones genéticas

progresivas, de carácter acumulativo. Este proceso va desde la inmortalización de una célula hasta su capacidad para producir una neoplasia maligna, eventualmente con carácter metastático. Para comprender mejor el tema es importante tener en cuenta algunas definiciones operativas.

Se entiende como transformación celular a un fenómeno observado in vitro que tiene varias cualidades:

Inmortalización: Es la capacidad de una población celular para crecer indefinidamente, a través de numerosos pasajes (o subcultivos), a partir del cultivo inicial. Un cultivo de células normales resiste sólo unos pocos pasajes, luego muere.

Por el contrario las células malignas pueden permanecer por tiempo indeterminado en subcultivos *in vitro* o transplantarse de un hospedador apropiado a otro.

Capacidad de crecimiento en agar blando: Cuando una suspensión de células normales se cultiva en un medio que contiene agar en baja concentración no crece. En cambio, si las células están transformadas crecerán formando microesferas, a partir de las cuales se podrán establecer cultivos inmortalizados. Este procedimiento técnico pone en manifiesto una propiedad de las células transformadas, que es la falta de dependencia de anclaje, es decir que no requieren de un soporte sólido para fijarse y multiplicarse.

Formación de focos: Un cultivo de células normales en un frasco de cultivo detiene su crecimiento cuando se forma una capa de una célula de espesor. A este fenómeno se lo denomina inhibición por contacto. Si el cultivo fuera de células transformadas, en cambio, esa inhibición se pierde y las células pueden crecer en focos unas sobre otras.

El fenómeno de tumorigénesis es más complejo y consiste no ya en un fenotipo transformado como se describió, sino en la capacidad de producir tumores cuando las células transformadas son inoculadas en sus respectivos huéspedes singeneicos o, en caso de que se trate de células humanas, en ratones inmunosuprimidos. Hay un gran salto cualitativo entre transformaciones celular y tumorigénesis, ya que esta última implica que las células transformadas han adquirido capacidades adaptativas nuevas (producto de nuevas mutaciones genéticas y selecciones clonales) como, por ejemplo, la de sintetizar factores angiogénicos tumorales, que garantizarán un aporte de

nutrientes a la masa tumoral en crecimiento que de otra forma evolucionaría hacia la necrosis.

Mientras que toda célula neoplásica está transformada, no toda célula transformada puede provocar tumores. Este es un concepto de importancia en el estudio de los virus oncogénicos. La mayor parte de la información disponible fue obtenida por el estudio de fenómenos de transformación in vitro inducida por virus. Si bien esto posibilitó avanzar notablemente en la compresión molecular de los mecanismos de transformación, no es suficiente para explicar la patogenia de una neoplasia inducida por un virus, ya que este caso intervienen factores mucho más complejos, como son la base genética de la especie animal en la que se desarrolla el tumor, la respuesta inmunitaria antitumoral, etc. El hecho de que un virus sea capaz de provocar transformación celular in vitro no implica que sea el agente etiológico de una neoplasia (38).

1.4.1 Carcinogénesis

La carcinogénesis es un proceso multifactorial y de múltiples etapas que, generalmente, no se produce por un único acontecimiento mutacional causado por una exposición circunstancial a un determinado agente carcinógeno, sino que se desarrolla a través de cambios genéticos moleculares acumulativos que son adquiridos a partir de la pérdida de la integridad del genoma por la exposición continua o repetida a factores de riesgo ambientales seguidos por evolución clonal (39,40).

El clásico modelo de carcinogénesis química en piel de ratón ha permitido comprobar que existirían dos importantes fases conocidas como **iniciación** y **promoción,** lo que se conoce como cancerización en dos etapas, definida por primera vez por Beremblum (41) a comienzos de la década del 40.

La piel del ratón es un órgano de gran utilidad para este tipo de estudios, ya que permite la administración localizada del agente carcinogénico y la visualización de las lesiones que se van produciendo a través del tiempo.

La **iniciación** es un proceso irreversible por el cual se producen cambios permanentes en el ADN de células blanco y es inducida por compuestos genotóxicos. La **promoción**, en cambio, es un fenómeno reversible que resulta de la expansión clonal selectiva y la proliferación de las células iniciadas. Las

células dentro de los clones pueden sufrir mutaciones adicionales originando células con mayor potencial de proliferación. Esta secuencia de mutación y crecimiento selectivo de nuevos fenotipos puede repetirse resultando en la aparición de tumores de mayor malignidad que son característicos de cada modelo, y algunos consideran a este hecho como la tercera etapa de la cancerización, la etapa de **progresión** (42). **Fig. 3**

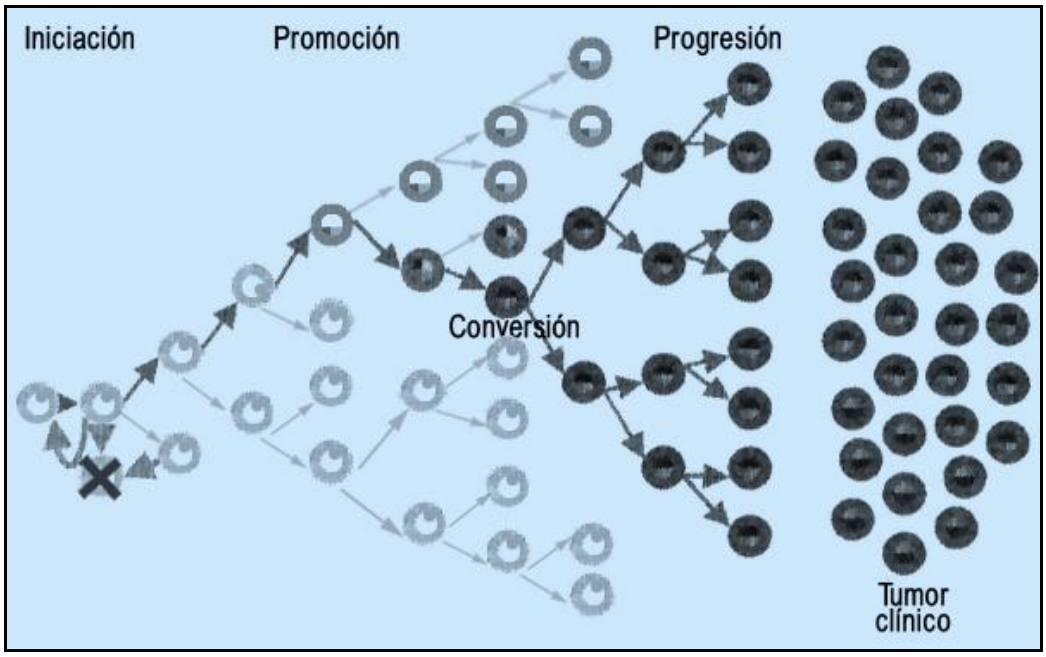


Fig.3: Representación esquemática de las distintas etapas de la carcinogénesis. De izquierda a derecha se grafican los eventos desde la mutación del DNA de la célula blanco, su expansión clonal, proliferación y crecimiento selectivo que llevan a la producción del tumor.

Las sustancias promotoras no son en general carcinogénicas por si mismas y, en ausencia de iniciación, producen cambios reversibles en la proliferación y expresión genotípica de las células, resultando en lesiones de tipo hiperplásico. La aplicación de una dosis subumbral de un carcinógeno completo, que en dicha dosis actúa sólo como iniciador, seguida por un tratamiento repetitivo con un promotor no carcinogénico induce la formación de tumores. A diferencia de la iniciación, la fase de promoción es reversible, requiriéndose una cierta frecuencia de aplicación para obtener tumores (43).

El orden de los tratamientos con iniciador y promotor es muy importante. Si se administran dosis repetidas del promotor previo a la iniciación, no se

desarrollan tumores, y esto mismo sucede cuando se aplica el promotor en un tiempo excesivamente largo después del iniciador. **Fig. 4.**

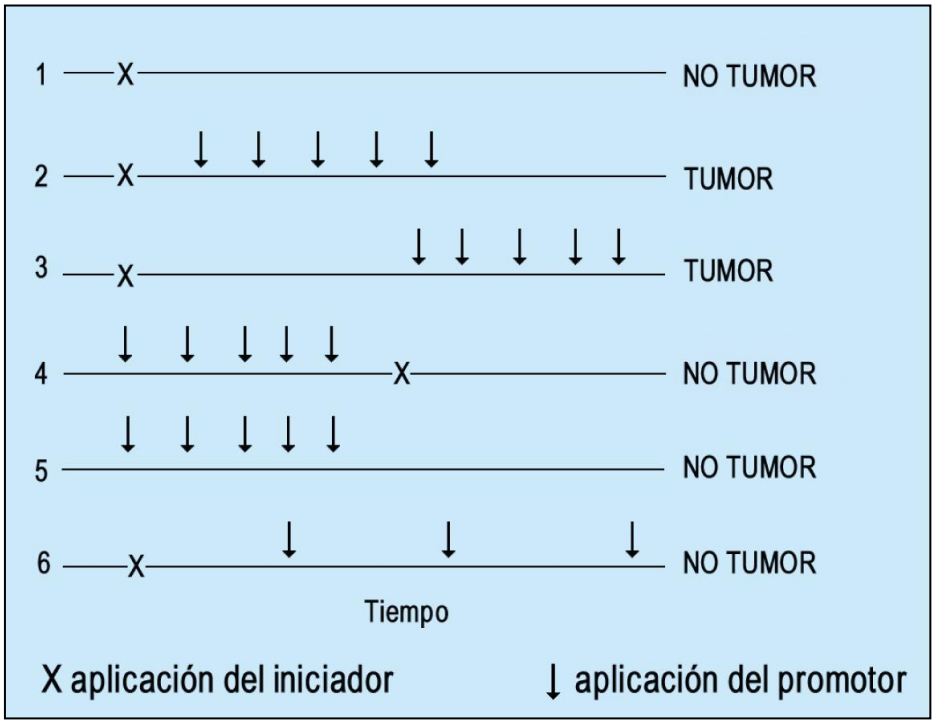


Fig.4: Esquema de carcinogénesis experimental en dos etapas: Cuando se aplica solamente el químico iniciador o el promotor no se obtienen neoplasias (1y5); la administración del promotor a repetición con un intervalo adecuado de tiempo entre cada aplicación provoca la aparición de tumores, aún cuando exista un amplio lapso entre el iniciador y la primera dosis de promotor (2y3); en cambio no se obtienen tumores si se suministra la droga promotora antes de la iniciadora (4), ni cuando los intervalos entre dosis de promotor son excesivamente largos, aunque se coloque después del iniciador (6).

1.4.1.1 Agentes cancerígenos iniciadores y promotores

Los agentes iniciadores, de acuerdo a su naturaleza, se clasifican en físicos, químicos y biológicos.

Entre los físicos está demostrada la acción iniciadora de las radiaciones ultravioletas y las radiaciones ionizantes.

Los iniciadores químicos son sustancias con capacidad de transformar células *in vitro e in vivo,* y que se hallan en diversos ámbitos. Básicamente se dividen en carcinógenos de acción directa, por ejemplo: clorambucil, ciclofosfamida, busulfán, diepoxibutano etc; y los indirectos que necesitan de una conversión metabólica o enzimática para producir metabolitos con capacidad transformadora como los hidro carburos aromáticos policíclicos, las aminas aromáticas y los colorantes azoicos.

Los carcinógenos iniciadores biológicos comprenden ciertos grupos de virus, básicamente los retrovirus, cuyo genoma es a ARN, y cuatro familias de virus a ADN, los papova virus, los adeno virus, los herpes virus, y los pox virus (éstos últimos producen tumores experimentales en animales pero no en humanos).

Los promotores tumorales pueden ser definidos como compuestos que muestran débil o nula actividad carcinogénica cuando se los utiliza en ausencia del iniciador, pero que inducen la formación de tumores cuando se los aplica repetidamente después de una dosis baja o subumbral de un iniciador (44-46).

Las sustancias promotoras, en ausencia de iniciación, producen cambios reversibles en las poblaciones celulares caracterizados por aumento en la proliferación y disminución de la diferenciación.

El modelo de carcinogénesis bucal presenta también esta secuencia de eventos que conducen a la célula normal hasta el cáncer clínico: iniciación, promoción, conversión y progresión. En términos clínicos se podrían ejemplificar las etapas de la carcinogénesis como:

- Período latente de la enfermedad: **iniciación.**
- Lesión cancerizable: **promoción.**
- Neoplasia benigna o carcinoma in situ: **conversión.**
- Tumor maligno: **progresión.**

El cáncer bucal es uno de los pocos cánceres de los cuales se puede obtener biopsias en todos sus estadios (38), desde mucosa normal hasta carcinoma invasor, pasando o no por estadios previos (lesiones cancerizables). Este hecho ha permitido definir un modelo de progresión genética de esta enfermedad y demostrar que tejidos con una apariencia normal o benigna pueden también contener cambios genéticos clonales, de manera que los cambios genéticos tempranos no necesariamente se correlacionan con cambios observables en su morfología (49). **Fig. 5.**

1.4.2 Evolución genética y molecular del cáncer oral.

El modelo de múltiples etapas de la carcinogénesis es extensamente aceptado (50) y requiere de la transición desde las lesiones pre-malignas al fenotipo metastático del tumor. Una variedad de estas alteraciones deben acumularse para favorecer esta transición (7) y gradualmente aumentar la malignidad. Una progresión similar se ha demostrado para el cáncer bucal (51)

desde una hiperplasia benigna, a la displasia, al carcinoma *in situ* y al cáncer avanzado, todo esto acompañado de alteraciones genómicas. Varias lesiones son de importancia particular para cáncer bucal: la leucoplasia (52), el liquen plano (53) y la eritroplasia (54).

Las **Leucoplasias** y los **Líquenes** son afecciones de la mucosa bucal que en algunas circunstancias son parecidas clínicamente pero que difieren en la etiología y en la patogénesis (55-57).

Generalmente se acepta que hay un riesgo aumentado de desarrollar cáncer bucal en aquellos pacientes que presentan leucoplasias o líquenes; es así que estas condiciones se categorizan, dentro del grupo de “lesiones blancas”, como potencialmente malignas (58-60).

La leucoplasia es sólo una diagnosis clínica que describe a las placas blancas que no pueden ser atribuidos a cualquier otra enfermedad (OMS). Con este concepto tan abarcativo la literatura internacional las describe especialmente en hombres mayores, y la asocian a un riesgo variable de alteraciones epiteliales subyacentes dependiendo de su localización. Aproximadamente el 10-15% de leucoplasias será diagnosticada como displasia leve o moderada y otro 5% se pueden diagnosticar como displasia severa o carcinoma en situ (61). El riesgo a largo plazo de la progresión al cáncer invasor varía entre los estudios del 4% a 18% (62-64) y requiere de un monitoreo clínico cuidadoso. .

En seguimientos de 1 a 31 años ha sido ampliamente aceptado que la leucoplasia bucal es una lesión potencialmente maligna, con porcentajes de transformación que van del 0% al 20%. No ha ocurrido lo mismo con el liquen plano (65,66) que es considerado por algunos autores como una condición pre-maligna antes que una lesión específica (67-69) mientras que a otros autores, fundamentalmente de la escuela latina, no les ofrece ninguna duda el hecho de que en determinadas circunstancias y librado a su evolución, el liquen rojo plano es cancerizable (58,61).

Mientras que Mignogna (70) recomienda un estricto seguimiento de los pacientes con liquen plano y Lanfranchi Tizeira H (71) publica un porcentaje de transformación del 6.51% especialmente en las formas erosivas y queratóticas de LP, más recientemente, Bornstein y colab. (72) encuentran un porcentaje de transformación de sólo el 2.84%.

En los años pasados se han descrito numerosas variantes de Leucoplasias y Líquenes fundamentalmente basados en la asociación con aspectos clínicos e histológicos peculiares.

Las leucoplasias han sido habitualmente asociadas al hábito de fumar (58) pero con alguna frecuencia no se ha podido identificar claramente un factor etiológico considerándoselas idiopáticas.

Grinspan (58) denomina primarias o primitivas a las leucoplasias que asientan desde su inicio sobre una mucosa sana y secundaria a las que resultan de la evolución de otra enfermedad, fundamentalmente líquenes y procesos ampollares y a ambas, de acuerdo a la lesión elemental que las caracterice, en mancha, queratosis y verrugosidad.

Luego del reporte de la OMS (59) se han propuesto diferentes clasificaciones, en particular, una de ellas (LCP Classification and Staging System), presentada en Uppsala, ha sido la mas aceptada internacionalmente ya que parece facilitar un modelo adecuado para los estudios clínicos e histopatológicos (73,74).

De acuerdo al criterio LCP, la evaluación clínica categoriza a las leucoplasias como homogéneas (H), sólo lesión de color blanco, y no homogéneas (NH), zonas lesionadas blancas que alternan con rojas. Se ha observado que la última está asociada a un mayor porcentaje de transformación maligna; especialmente una forma agresiva que inicialmente se presenta como una simple hiperqueratosis. Hansen y colaboradores (75) llamaron a esta forma especial de la leucoplasia, proliferativa verrugosa (LPV), una acepción luego aceptada por Murrah y Batsakis (76).

Es de destacar Grinspan (58) considera a las leucoplasias no homogéneas o moteadas como aspectos clínicos de distintas entidades:

- Leucoplasias no homogéneas verdaderas.
- Leucoplasias infectadas con cándida.
- Candidasis crónicas.
- Aspectos iniciales de carcinomas verrugosos o papilomatosis oral florida.

Por el contrario, los eventos descriptos por Hansen (75) eran aquellos de una enfermedad de origen desconocido que comenzaba como una simple hiperqueratosis

y que se difundía localmente o a otros sitios haciéndose multifocal y proliferativa. Con el tiempo, las lesiones se volvían exofíticas y con apariencia verrugosa, desarrollando

áreas eritematosas que alternaban con parches blancos y tomaban el aspecto de una leucoplasia nodular. Describieron 10 estadíos histológicos que progresaban desde mucosa normal hasta carcinoma espinocelular poco diferenciado pasando cuadros de hiperqueratosis, hiperplasia verrugosa y carcinoma verrugoso entre otros. Estos aspectos también fueron mencionados por Shear y Pindborg en 1980 (77) y por Ragendran y col. (78) que observaron un cambio gradual de una lesión hiperplásica verrugosa a un carcinoma en el 48% de 426 pacientes con carcinomas verrugoso y placas blancas leucoplásicas concomitantes.

En la evaluación histológica se observa un patrón exofítico verrugoso con hiperplasia bulbosa del proceso de las rete, y la displasia es un hallazgo a futuro.

Tanto la hiperplasia verrugosa como el carcinoma verrugoso son procesos exofíticos; pero en la última condición la hiperplasia de las crestas interpapilares es más amplia y se extiende más profundamente en el epitelio adyacente no involucrado, formando hendiduras y extensiones en profundidad (76).

Es probable que estas entidades tan bien descriptas por Hansen y Murrah sean lo que Grinspan y Abulafia, de la escuela estomatológica argentina, denominan formas iniciales y desarrolladas de la Papilomatosis Oral Florida y también describen que pueden evolucionar a Carcinomas Verrugosos y/o a Carcinomas Espinocelulares (7).

El líquen plano es también común y se estima incurrir en un riesgo del 1-4% para desarrollar cáncer (79), se cree que es una enfermedad autoinmune (80) y el mecanismo de su conversión maligna no está todavía entendido

Inicialmente descrito por Wilson en 1869 (81), el líquen plano es una enfermedad que afecta la piel, el cuero cabelludo, las uñas y la mucosa; es de curso crónico y puede malignizarse (60,82). La causa de esta patología se desconoce pero se considera que hay factores inmunológicos involucrados (83).

Grinspan D (57,60) clasifica a los líquenes de acuerdo a sus manifestaciones clínicas en típicos y atípicos. Considera típicos a aquellos que se presentan como manchas blancas (puntos, líneas, redes, anillos) sobre una mucosa de aspecto normal o eritematosa; y atípicos a las formas ampollares, erosivas, pseudovegetantes, atróficas, escleroatróficas, queratóticas y verrugosas.

La eritroplasia, que como su nombre lo indica, se manifiesta como una lesión roja de aspecto aterciopelado es rara pero tiene un riesgo muy elevado de progresión
(14-50%) y se diagnostica con frecuencia histológicamente como carcinoma *in situ* o displasia epitelial severa (2)

La leucoplasia, el liquen plano y la eritroplasia bucal pueden demostrar varios grados de anormalidades histológicas que van de la displasia leve al carcinoma in situ. Un subconjunto de estas lesiones progresará al cáncer y necesitará de un tratamiento temprano y agresivo mientras que otros pueden progresar lentamente. Esta progresión se ha ligado a la presencia de la inestabilidad genómica y a la aparición de alteraciones genómicas extensas, (84) tales como la aneuploidía. De hecho, la evaluación de la influencia de las alteraciones genómicas puede suplantar a los marcadores tradicionales que no pueden predecir el curso de las lesiones pre-malignas en el tiempo.

1.4.2.1 Teoría de la cancerización del campo.

Se asume que la sumatoria de alteraciones genómicas durante la progresión fenotípica sucede en una amplia población de células originando" un campo heterogéneo de células genéticamente alteradas" que se espera que dé lugar a lesiones precursoras. Esta teoría, primero propuesta por Slaughter y col. (85), intenta explicar la frecuente recidiva local y la aparición de segundos tumores primarios en el cáncer de cavidad bucal. Según una adaptación reciente de este concepto, (86,87) las células genéticamente alteradas pueden proliferar y expandirse gradualmente a un campo no modificado que es vulnerable a daño genómico adicional. Este campo, a pesar de ser macroscópicamente imperceptible, es tierra fértil para la evolución a lesiones pre-malignas y eventualmente a cáncer invasor. Aunque la extirpación local puede eliminar totalmente un carcinoma, el campo puede persistir y el paciente puede estar en

riesgo para la aparición subsecuente de un segundo tumor originado en el mismo campo. **Fig. 5.**

Las características moleculares exactas de un campo genéticamente alterado no están bien definidas pero las vías supresoras de tumores, por ejemplo TP53 (88) CDKN2A (88) y el pRb (89) están probablemente comprometidas desde sus estadios tempranos.

1.4.2.2 Aberraciones cromosómicas comunes.

Una gran variedad de aberraciones cromosómicas se pueden encontrar en la mayoría de los tipos de cáncer, incluyendo el cáncer oral. El impacto de estas aberraciones varía perceptiblemente y la significación histológica y clínica es con frecuencia incierta. Se cree generalmente que el número de aberraciones aumenta constantemente durante la progresión del cáncer: La leucoplasia bucal, comparada con el cáncer, tiene pocas aberraciones cromosómicas (90) y un estadio inicial del tumor, T1, presenta menos aberraciones que en las etapas más avanzadas, T2 (91). Algunas aberraciones se han descrito como tempranas y pueden tener una significación pronóstica considerable para pacientes con lesiones precancerosas o con cánceres en estadío inicial. Tales aberraciones se pueden ligar a importantes genes blanco tales como TP53 en 17p13, RB1 en 13q14 o el gen de CDKN2A en 9p21. Particularmente, varios informes indican el alto predominio de pérdida de heterogocidad (LOH) o de deleciones homocigóticas en 3p, 9p, 13q y 17p.67, 97 en lesiones bucales tempranas. El cromosoma 9 parece ser uno de los blancos más tempranos y la pérdida de alelos de la región 9p21, está asociado posiblemente a los genes que codifican los inhibidores de las ciclinas-dependientes de quinasa p16 y p14, que están presentes en las lesiones (92) pre-cancerosas y en el cáncer bucal (93,94). **Fig. 5.**

Con el advenimiento y la popularización de nuevos y masivos métodos de estudio, hay una abundancia de la información en relación a las aberraciones cromosómicas en cáncer bucal. Sin embargo, debido a la variabilidad de los resultados y a su dependencia de la etapa del cáncer, de la localización y de otros factores, se requiere de estudios adicionales.

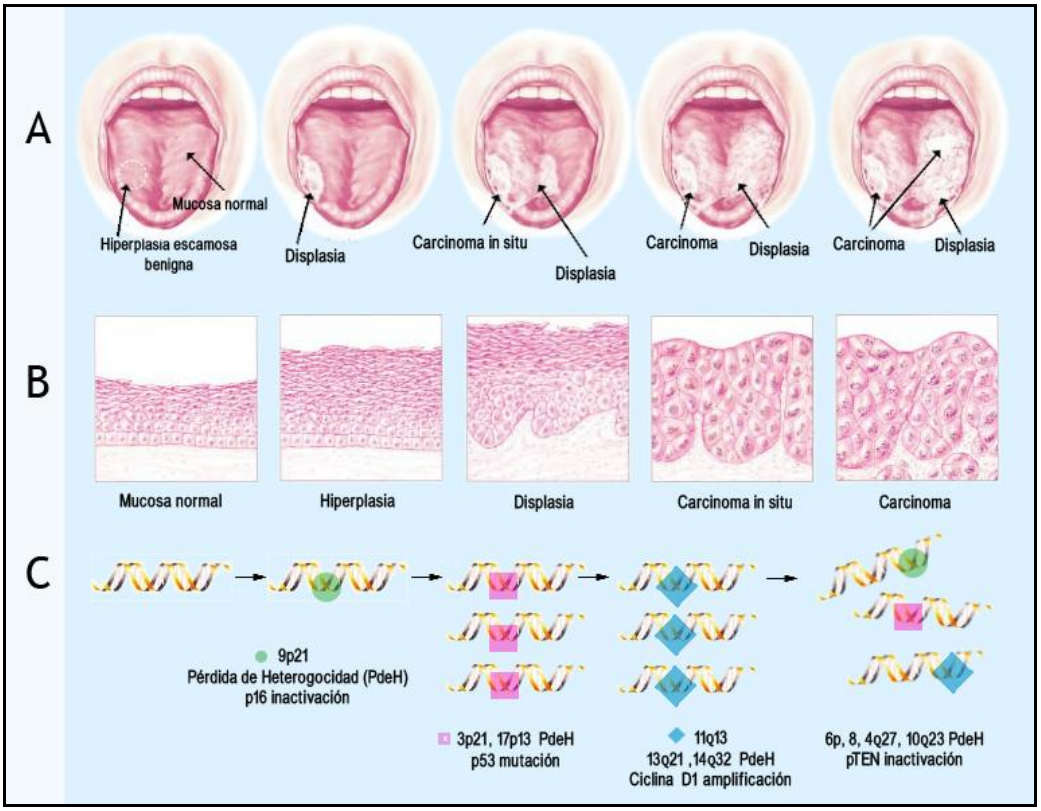


Fig.5: Progresión clínica, patológica y molecular del cáncer bucal. El panel A muestra la evolución clínica de la mucosa normal hacia el CE. La biología molecular ha llevado al entendimiento de la teoría de cancerización del campo (84). En la mayoría de los pacientes, la repoblación celular en áreas geográficamente distintas da lugar a que se originen lesiones clínicas múltiples. A pesar de que éstas tengan diferentes patrones histológicos, se originan en la misma célula. En el panel B se grafica la progresión histológica de mucosa normal a CE. La mucosa de apariencia normal ya muestra cambios genéticos tempranos, panel C, frecuentemente con pérdida de 9p21 e inactivación de p16. La progresión hacia la displasia presenta mayores cambios genéticos y el CIS tiene los mismos cambios que el CEI. Modificado de N Engl J Med 2001; 345:1890-1900.

1.4.2.3 Protooncogenes, oncogenes y genes supresores de tumores.

Dado que los virus oncogénicos operan sobre protooncogenes, oncogenes y genes supresores de tumores, es necesaria una breve mención de cada uno. Se los descubrió investigando la etiología tumoral por lo que se los denominó genéricamente oncogenes (95).

Protooncogenes: Son genes celulares normales que juegan un papel esencial en la diferenciación y en la proliferación celular. Intervienen en todos los puntos conocidos que conducen a la proliferación celular: la interacción de un ligando externo con un receptor ubicado en la membrana plasmática, la transducción de la señal a través de la membrana y su posterior transmisión

hacia el núcleo, (frecuentemente mediada por mecanismos de fosforilación de proteínas), y la transcripción y replicación del ADN que llevará a la división celular.

Oncogenes: Son protooncogenes alterados por mutaciones, por translocaciones o por amplificación de su transcripción. La activación por traslocación ocurre, por ejemplo, cuando luego de una ruptura cromosómica un protooncogen es colocado cerca de un promotor fuerte o un *enhacer*. La amplificación es el aumento de la expresión de un protooncogen por aumento del número de copias (hay duplicación de la secuencia del protooncogeén) o por traslocación.

Existen varios mecanismos para la activación de un oncogen, lo que conduce a la transformación maligna de una célula (95): **Fig. 6**

- Las mutaciones en la secuencia de nucleótidos del protooncogen son en general puntuales, es decir, en un solo aminoácido, pero suficientes como para conferirle a la proteína resultante funciones anormales
- La amplificación (existencia de muchas copias de un gen) de un protooncogen, que aumenta la cantidad de proteína inducida y dificulta la acción de los mecanismos regultorios.
- Una alteración en la ubicación del ADN de un protooncogen (debido, por ejemplo, a una traslocación del fragmento de ADN que lo contiene hacia otra localización donde se ve sometido a diferentes mecanismos de control), o el funcionamiento alterado de los mecanismos regulatorios para la expresión de un oncogen (por ejemplo, la inserción de un promotor viral cerca de un protooncogen).
- Un defecto en el control post-transcripcional de la expresión del gen, que reduce la destrucción del ARNm o la proteína normal.

Genes supresores de tumores: Son genes que normalmente inhiben la proliferación celular, como por ejemplo el Rb o el p53 (36).

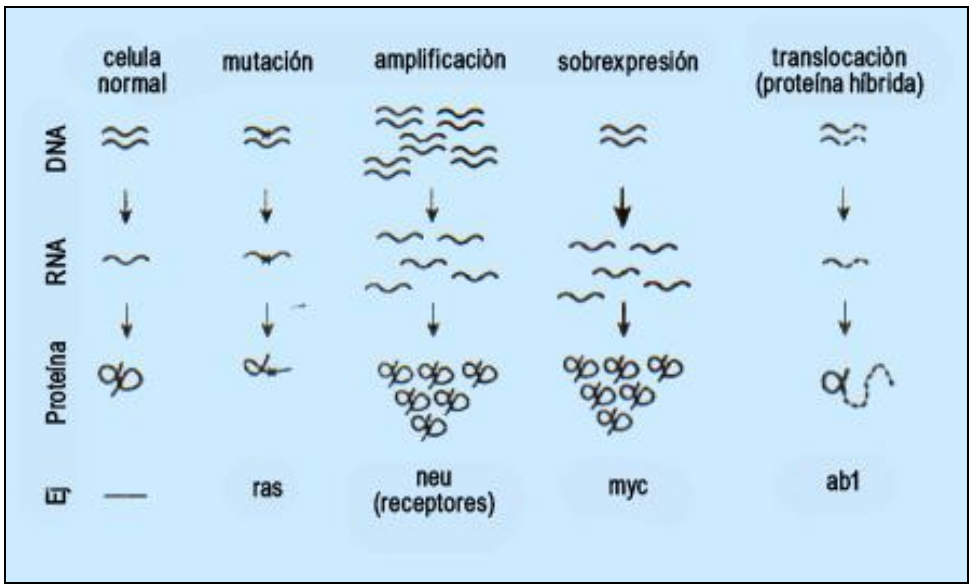


Fig.6: Alteraciones genéticas que pueden producir disfunción del ciclo celular. Se observa en la columna izquierda un gen normal que produce el ARNm correspondiente y la subsiguiente proteína normal. En las siguientes columnas se representan los diferentes niveles de alteraciones que llevan a la transformación celular: en la mutación, una modificación del ADN produce un ARNm anormal, y, por consiguiente, una proteína anormal; la amplificación y la sobre expresión producen cantidades excesivas de proteína normal, en el primer caso por aumento en la cantidad de genes que la codifican, y en el otro caso es el aumento en la expresión del ARNm lo que lleva a la producción exagerada de proteína; la tras locación es otro tipo de mutación que produce una proteína diferente de la normal.

Los oncogenes fueron descubiertos primeramente en virus con capacidad de transformar células. El primero fue el gen de una proteína codificada por el virus del sarcoma de Rous, un retrovirus que induce sarcomas en aves.

Se antepuso una “v” a los oncogenes presentes en el genoma de un virus y mas adelante se encontró que prácticamente todos los oncogenes virales, v-onc, tenían una contraparte casi idéntica en el genoma de células normales, por lo que a éstos se los denominan precedidos de la letra “c”, c-onc (96).

Posteriormente, y a partir del conocimiento de que los oncogenes, en células normales, producen proteínas que controlan eventos celulares básicos como la diferenciación y la proliferación celular, se hace un distingo en la denominación de los c-onc, recibiendo el nombre genérico de protooncogenes cuando su acción se halla dentro de los parámetros de la normalidad, y c-oncogenes, cuando producen las proteínas alteradas de las células transformadas.

Estas proteínas asociadas a transformación celular pueden ser divididas en 7 categorías de acuerdo a la clasificación enunciada por Hunter (97).

Clase 1: oncoproteínas similares a hormonas o factores de crecimiento, por ejemplo *sis, int, hst*. Estas proteínas son secretadas al exterior de la célula estimulando el crecimiento celular en forma paracrina o auto crina.

Clase 2: proteínas con función de quinasa tirosina. Son proteínas de la superficie interna de la membrana plasmática que ejercen su acción sobre otras proteínas de membrana o sobre proteínas citoplasmáticas.

Clase 3: receptor de angiotensina sin actividad de proteína quinasa que se halla en la membrana plasmática.

Clase 4: proteínas involucradas en el ciclo de guanosina trifosfato/difosfato (proteínas G), que son los oncogenes de la familia ras (*n-ras, K-ras, H-ras*) Se encuentran en la cara interna de la membrana plasmática. Cumplen funciones en la transducción de señales desde fuera de la célula hacia adentro.

Clase 5: proteínas citoplasmáticas con actividad serina quinasas que tiene que ver con los segundos mensajeros en la transducción de señales.

Clase 6: proteína del oncogen *crk*, es citoplasmática y se une a proteínas que contiene fosfotirosina, sugiriendo un papel en la regulación de estas últimas.

Clase 7: proteínas nucleares que actúan como factores de transcripción, regulando la expresión del ADN, ejemplos de ellas son el *myc, fos, myb, p53*, etc. Estos factores nucleares pueden representar el último paso de la cascada de transducción de señales.

En general es necesaria la activación de más de un oncogen para que una célula se transforme y comúnmente varios oncogenes deben cumplir diferentes funciones.

Los llamados antioncogenes o genes supresores de tumor son tan importantes como los oncogenes en la etiología tumoral. La función normal de estos genes es producir proteínas que regulan negativamente el ciclo celular induciendo, por ejemplo, a la diferenciación o a la muerte por apoptosis. La mutación o deleción de estos genes elimina la acción supresora normal conduciendo a una proliferación celular continua y anómala (98).

A estos genes se los llamó antioncogenes debido a la acción que ejercen contraria a la de los oncogenes.

El primero de los genes supresores de tumor descubierto es el RB-1, cuya carencia provoca el desarrollo del retinoblastoma, un tumor de la niñez (99).

Otro ejemplo característico es el gen de la proteína p53, del cual primero se pensó que era un verdadero oncogen ya que se halla sobre expresado en varios tumores. Pero luego se descubrió que en realidad era una forma mutada de la proteína normal y que en muchos tumores, uno de los alelos presenta una mutación y el del otro cromosoma no se encuentra por haber sido delecionado (100).

1.4.2.4 Factores de crecimiento.

Los factores de crecimiento o growth factors (GF) son sustancias de naturaleza polipeptídica que se encuentran generalmente glicosiladas. Ejercen su acción mediante una interacción de alta afinidad con receptores que, en su gran mayoría, son de membrana. Dicha interacción gatilla una cascada de señales bioquímicas intracelulares que resulta en la activación o represión de varios genes implicados en la proliferación celular.

El factor del crecimiento epidérmico (EGF epidermal growth factor) es un mitógeno general de las células epiteliales y mesenquimáticas. Un mitógeno puede favorecer la transformación, sin inducirla, a través de la proliferación celular que aumenta estadísticamente la probabilidad de error en las divisiones celulares (101).

La familia de receptores ErbB y el receptor del factor del crecimiento epidérmico, particularmente (EGFR epidermal growth factor receptor), también conocido como ErbB1 o Her-1, han recibido atención debido a su capacidad de estimular la proliferación de las células epiteliales (102). EL EGFR se encuentra en un considerable porcentaje de tumores orales y también en las lesiones premalignas (103,104). Aunque varios estudios demuestran asociación entre la sobre-expresión de EGFR y el grado del tumor o el estadío son pocos los estudios que determinan su utilidad clínica. Otros miembros de la familia de ErbB pueden también ejercer efectos transformantes. El ErbB2, también conocido como Her-2 o Neu, parece ser más frecuente en el cáncer bucal que en el cáncer de cabeza y cuello. Altos niveles de ErbB2 se puede asociar a un peor pronóstico (105).

1.4.2.5 Angiogénesis

Angiogenésis, es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes, es un paso crucial en el crecimiento del tumor, progresión y

metástasis. La regulación de la angiogénesis in vivo es compleja y es controlada por una variedad de factores. Entre ellos VEGF (factor endotelial vascular del crecimiento) se considera que desempeña un papel dominante (106).

Ha sido establecido que el VEGF promueve la progresión de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello por medio del aumento de la densidad de los pequeños vasos capilares (107,108). El incremento de su expresión en los tumores malignos bucales se pueden desencadenar por una hipoxia (107) además, la expresión de VEGF-C se ha divulgado ser un predictor confiable de la metástasis regional del nódulo de linfático en el CE inicial (109,110). La expresión de Flt-4, miembro de la familia de los receptores de VEGF, también ha sido correlacionada con la metástasis linfática, lo que concuerda con su expresión preferencial en el endotelio linfático (111).

Metaloproteinasas. del ECM (matriz extracelular). Su acción es crucial durante la progresión del cáncer puesto que permiten remodelar los tejidos sanos que rodean al tumor y así permiten la invasión local. La expresión immunohistoquímica de dos de estas metaloproteinasas, las gelatinasas MMP-2 y -9 se relaciona con el potencial invasor del CE (112). Sin embargo, la expresión de MMP-2 parece ser más prominente que la de MMP-9 en las muestras de CE y se correlaciona con las metástasis en los nódulos linfáticos (113). Otro hallazgo interesante es la asociación entre la sobre-expresión de MMP-2 y MMP-9 y el consumo del alcohol, que condujo a los investigadores a presumir que la contribución del alcohol en el proceso carcinogenético del CE se puede atribuir a la sobre-expresión de estas dos enzimas (112).

La **Fig.7** ofrece un modelo simplificado de la carcinogénesis oral. Las alteraciones iniciales parecen ocurrir en la capa de células basales bajo influencia del humo, del alcohol y/o de otros agentes carcinógenos y puede implicar la desactivación del TP53 y de las otras llaves supresoras del tumor. La transición del epitelio normal a cáncer invasor es a menudo progresivo y está acompañado por golpes o eventos (hits) múltiples que promueven la proliferación, la angiogénesis, la invasión local y, eventualmente, la extensión metastásica a distancia.

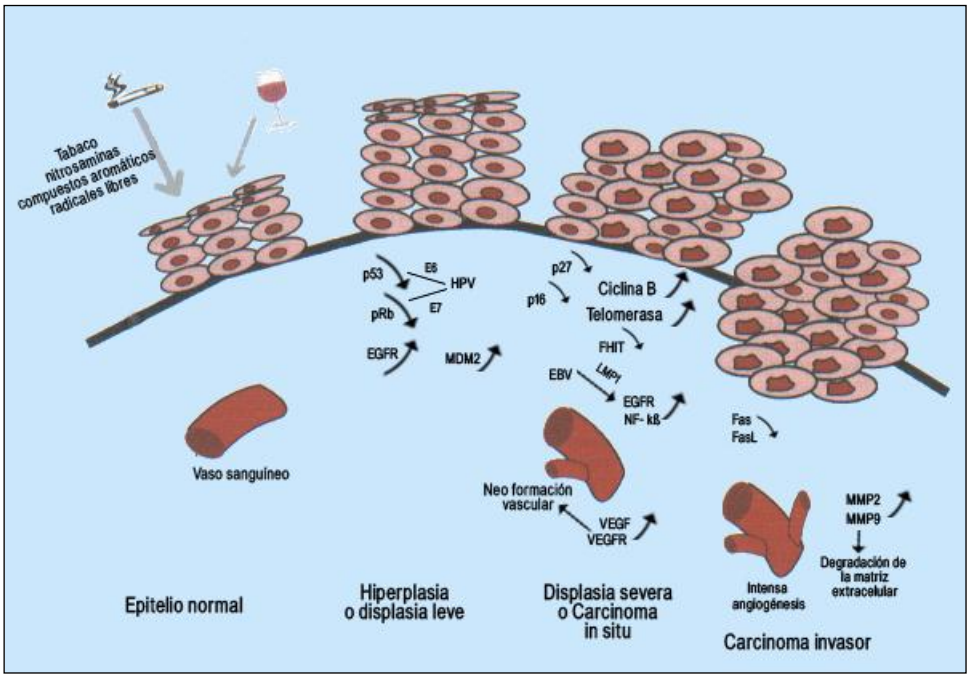


Fig.7: modelo teórico de carcinogénesis en la cavidad bucal basada en la hipótesis de los múltiples golpes o 'hits'. La mayoría de las lesiones moleculares/genéticas que acompañan la transición histológica de epitelio normal al canceroso persiste durante las fases más posteriores del desarrollo tumoral, pero están aquí representadas en la etapa inicial. Modificado de Advances in the biology of oral cancer, Oral Oncol (2006), doi:10.1016/

1.5 Factores de riesgo.

El desarrollo de un tumor maligno involucra complejas interacciones entre factores exógenos (ambientales) y endógenos (genéticos, hormonales, etc.)

Varios estudios han divulgado un componente familiar significativo en el desarrollo del cáncer bucal. Las estimaciones de riesgo en los parientes de primer grado de los pacientes con cáncer varía extensamente y se ha divulgado, en varios estudios, ser del 1.1, (114) 2.5, (115) 3.5 (116) o 3.8 (117), aunque debe ser observado que algunos de estos reportes se refieren al cáncer de la cabeza y del cuello en general. Los pacientes con cáncer bucal que tienen parientes con tumores respiratorios y digestivos del área superior tienen más probabilidades (odds ratio 3.8) para desarrollar un segundo tumor primario, (118) lo que es una causa importante del fracaso del tratamiento.

La asociación familiar del cáncer bucal, posiblemente con una herencia autosómica dominante, fue divulgada en un porcentaje muy pequeño de los pacientes con cáncer bucal (119).

Hay cánceres hormono-dependientes como son el de mama, el de próstata y el de endocérvix, así por ejemplo el cáncer de próstata no se ve en eunucos y el de mama disminuye su incidencia en las mujeres a quienes les extirparon los ovarios y el de endometrio no se observa en mujeres cuando entran a la menopausia pero puede aparecer si reciben estrógenos (7).

Múltiples factores de riesgo exógenos se mencionan asociados al desarrollo de carcinomas espinocelulares de la mucosa bucal. Los más estudiados son la exposición crónica al tabaco y al alcohol, pero también se han tomado en consideración la irritación mecánica crónica y las infecciones por bacterias, hongos y virus y los factores vinculados a la dieta (120).

1.5.1 Tabaco

A nivel experimental ya en 1930 Roffo (121) obtuvo carcinogénesis en animales en los que insufló tabaco tratándolos previamente con dieta hipercolesterolémica.

También experimentalmente, Freedman y Shklar (122) consiguen provocar cánceres bucales en hámsters sometidos a la acción del alcohol.

Por su parte, Wynder y col. (123) hallan que si bien el tabaco y el alcohol aumentan el riesgo de carcinoma separadamente, juntos lo multiplican.

La Agencia Internacional para Investigación en Cáncer-International Agency for Research on Cancer: IARC (124)- considera que hay evidencia suficiente para considerar al hábito de fumar como factor causantes de cánceres de pulmón, faringe, laringe, esófago, páncreas, vejiga y pelvis renal, fosas nasales, senos paranasales, estómago, hígado, cuello de útero y leucemia mieloide.

El tabaco es el principal factor de riesgo conocido para el cáncer de boca. Aquellas personas que fuman presentan un riesgo mayor de padece cáncer que aquellos que no lo hacen, según se ha estimado en diversos estudios de casos y controles.

Desde que en 1997 Zheng T y col. (125) observaran que el índice Odds ratio para los fumadores era de 2,73, y La Vecchia (18) encontrara que dicho Odds ratio era de 11,1 numerosos estudios se han publicado al respecto (126-132).

En estudios de casos y controles, Castellsagué y col. (133) observaron que también aquellas personas ex fumadoras presentaban un mayor riesgo de padecer cáncer bucal.

El riesgo de padecer cáncer de boca varía con la forma en que se fuma tabaco y el tipo de tabaco utilizado, y la cantidad, ya que existe una relación dosis efecto que es apreciable tanto en relación al promedio individual de cigarrillos fumados por día, a la cantidad total de años de fumar, y a la cantidad total de cigarrillos fumados toda la vida (18, 125, 126, 129, 131).

1.5.2 Alcohol

A pesar de que nunca se ha podido demostrar que el etanol puro es carcinogénico en experimentos de laboratorio, actualmente se consideran a las bebidas alcohólicas como un importante factor etiológico en el desarrollo del cáncer oral.

Estudios realizados en Inglaterra y Escocia por Hindle I y col. (134) sugieren que el aumento del consumo de alcohol desde los años cincuenta estaría más relacionado que el consumo de cigarrillos a la mayor incidencia de cáncer oral y a una mayor mortalidad del mismo, especialmente en hombres jóvenes.

Moreno-López y col. (127) establecen que si se consumen más de 50g de alcohol diario el riesgo es de un OR odds ratio de 5.3.

Por su parte Fioretti y col. (135) observaron que el mayor riesgo de padecer cáncer de la cavidad oral y la faringe en pacientes que nunca habían fumado estaba dado por el consumo de alcohol especialmente vino con un odds ratio (OR) cerca de tres veces mayor en los bebedores que en los abstemios. Ogden GR (136) encontró una relación directa con la duración del hábito con un OR de 3.6 (95% de intervalo de confidencia: CI, 1.2−11.2) para los bebedores por 35 o más años.

1.5.3 Irritación mecánica

En 1926, James Ewing (137), llama la atención acerca de un tipo de trauma consistente en fuerzas repetidas leves que, bajo ciertas condiciones, parece tener relación con el cáncer.

En 1961 Renstrup y colaboradores (138) obtuvieron efectos carcinogénicos en el hámster por medio de la irritación mecánica, y en esta década comenzó a

establecerse la hipótesis de la influencia de la inflamación crónica consecutiva a un trauma y no de la injuria física por sí misma.

En 1974 Monkman y col. (139) consideran el trauma en tres fases de malignidad: 1) la producción de tumores malignos primarios; 2) agravamiento de cánceres pre-existentes; 3) diseminación metastásica de las neoplasias. Este tipo de irritación mecánica también se muestra como factor importante en el cáncer de cuello de útero. Las investigaciones hechas en órdenes religiosas abstinentes comprueban una incidencia mucho menor de ese cáncer en esos ambientes. Diferencias similares se producen según estadísticas comparativas entre mujeres vírgenes y multíparas.

La cavidad bucal, es precisamente, el lugar donde las causas traumáticas son más evidentes generando ulceraciones que son muy cancerizables, especialmente las localizadas en el borde de la lengua (60).

Recientemente, Perez MA, Raimondi AR, e Itoiz ME (140) comunicaron que la úlcera traumática crónica (UTC) podría incrementar el riesgo de transformación maligna en pacientes con iniciación tumoral subclínica. Ellos sostienen que el tejido de granulación de la UTC actuaría como un promotor ya que este tejido induce la proliferación epitelial pero la curación no ocurre porque es permanentemente impedida por la irritación constante.

1.5.4 Infección con cándida

Robinson y Tasker en 1947 (141) sostuvieron que la infección crónica con cándida podía ser precancerosa. Posteriormente, en 1968, Cawson y Lehner (142) hicieron la misma sugerencia.

Si bien la Organización Mundial de la Salud acepta sólo como una posibilidad la transformación carcinomatosa de la candidasis crónica, Grinspan (60) afirma que ésta es un proceso cancerizable y duda en ubicarla dentro de las afecciones de frecuente o de posible transformación maligna.

De acuerdo a numerosos autores la infección con Cándida no sólo causa hiperplasia epitelial sino también puede inducir atipia epitelial conduciendo a cambios malignos.

Renstrup G (143) reportó el hallazgo de atipia epitelial en el 71% de los casos de leucoplasia moteada y en el 40% de todas las candida leucoplasias.

En 1987, Krogh y colaboradores (144) publicaron que las cadenas de candida con alto potencial de nitrosación fueron aisladas generalmente de lesiones con cambios precancerosos más avanzados. Las levaduras estaban presentes en la porción superficial del epitelio de las lesiones como micelios de ramificación, y en algunos casos se extendían de la superficie mucosa a las células epiteliales más profundas. Esto representaría un sistema de transporte que podría conducir los precursores presentes en la saliva de la superficie mucosa a la parte más profunda del epitelio donde la nitrosamina producida podría ser depositada. Así, esta evidencia adicional apoya la hipótesis de que ciertas cadenas de la Candida albicans desempeñan un papel causal en el desarrollo del cáncer oral, por medio de la producción endógena de la nitrosamina.

En modelos animales, la infección con Cándida puede inducir displasia epitelial cuando es inoculada a lesiones hiperplásicas no displásicas (145). Por su parte, Barrett AW y colab (146) revisaron 223 biopsias y reportaron que hay una asociación positiva estadísticamente significativa entre la infección micótica y la displasia moderada y severa. El análisis de biopsias subsecuentes mostró que la displasia epitelial asociada a la infección con cándida empeoraba significativamente con el paso del tiempo en comparación con la displasia epitelial no infectada. En un estudio reciente, McCullough M y colab (147) usando la técnica del enjuague bucal, también describen una correlación significativa entre la displasia epitelial y la cantidad de hifas en 223 pacientes a los que se realizó biopsia para investigación de lesiones de la mucosa oral.

En el 44.6% de los pacientes que tenían diagnóstico histopatológico de displasia epitelial o carcinoma espinocelular, la frecuencia con que se encontraron levaduras orales fue significativamente mayor ($p<0.001$) que en aquellas muestras sin dichas lesiones histopatológicas. El precedente junto a la evidencia clínica, sugiere que más del 15% de las lesiones de candidasis crónica hiperplásica pueden progresar a lesiones displásicas (148) y resalta la importancia de un seguimiento de aquellas lesiones que no se resuelven luego de una terapia apropiada.

Sin embargo, Sitheeque. y Samaranayake (149) especulan que el aumento en la colonización y la infección asociada a la displasia es enteramente coincidente reflejando un cambio en las condiciones ambientales que llevan a

la proliferación de este comensal. Sostienen que si la infección crónica con cándida fuese un importante co-factor en la carcinogénesis, muchos más pacientes con candidasis crónica deberían desarrollar carcinomas orales. Quizás este hecho se deba a los atributos genotípicos de las levaduras, que pueden ser más virulentas, en este respecto, que otras.

En la actualidad el rol probable de la cándida en la carcinogénesis oral no es claro.

1.5.5 Infección con virus

Avances en las investigaciones virológicas y epidemiológicas han aumentado el reconocimiento de la importancia de la infección con el virus del papiloma humano (HPV de las siglas en inglés, Human papilloma virus).

La infección por HPV es la enfermedad de transmisión sexual más prevalente en la actualidad. Se calcula que uno de cada tres individuos sexualmente activos puede estar infectado con un tipo de HPV (150) y se estima que se diagnostican un millón de nuevos casos cada año (151).

La mayoría de las infecciones por HPV son subclínicas y asintomáticas. Cuando ocurre las manifestación clínica habitualmente se presenta en forma de lesiones proliferativas benignas (las verrugas y los condilomas).

En la década del 80 se prestó especial atención a los HPVs por su habilidad para mediar la conversión maligna de células al observarse una fuerte asociación entre ciertos tipos de HPV y el carcinoma de cuello de útero. Este hecho incentivó la investigación en este campo y no sólo en esta localización sino también en piel, y en mucosas anogenital, laríngea, esofágica, y oral.

El rol de la infección por HPV en la etiología del cáncer bucal fue inicialmente indicado en 1983 por Syrjanen y colab en (152) seguido por de Villiers y col. en 1985 (153) quienes detectaron la presencia de HPV en el 43% de carcinomas de lengua.

Numerosos estudios en los países occidentales han demostrado la presencia de HPV en lesiones pre-malignas y malignas de la cavidad bucal con una amplia variación en la prevalencia de los mismos (0-100%), probablemente reflejando las diferencias inherentes a las distintas poblaciones estudiadas así como la de las diferentes técnicas utilizadas en la recolección de las muestras y los distintos medios de detección usados (154,155).

La gran prevalencia de la infección por el virus del papiloma humano y su potencial de transformación maligna lo hace un patógeno de gran importancia en la clínica.

1.5.5.1 Oncogénesis viral.

Los virus oncogénicos pueden ser considerados desde dos puntos de vista:

- Como agentes infecciosos involucrados en la patogenia de algunas neoplasias y
- Como herramientas experimentales para el estudio de los mecanismos moleculares que intervienen en la transformación celular.

La existencia de estos virus fue reconocida a partir de 1908, cuando Ellerman y Bang demostraron que una leucemia de los pollos era transmisible a otros animales de la misma especie por la inoculación de filtrados libres de células. En 1911, Rous obtuvo resultados similares con un sarcoma de pollos. En 1932, Shope descubrió el virus productor de papilomas en conejos salvajes, y en 1936 Bittner reportó la existencia de un virus transmisible por la leche asociado a las neoplasias de las glándulas mamarias en una cepa de ratones. Un hito de importancia fue el descubrimiento de virus productores de leucemias murinas, realizado por Gross en 1951. A comienzos de la década de 1980 Gallo y su equipo descubrieron el primer retrovirus humano asociado a leucemias, el HTLV-I y con el desarrollo de los métodos de ADN recombinante y la expansión de la biología molecular, se profundizó mucho la comprensión de los mecanismos que llevan a la transformación de una célula normal en neoplásica.

Hay investigadores que son escépticos al considerar algunos virus como agentes etiológicos de neoplasias humanas, mientras que otros plantean que hasta un tercio de los cánceres humanos estaría asociado directa o indirectamente con virus. Hoy, los datos epidemiológicos, clínicos y experimentales permiten postular una estrecha asociación entre algunos virus (Hepatitis B, Papiloma humano, Herpes 8, Herpes 6) y el desarrollo de malignidades.

Existe consenso en que los virus oncogénicos son factores necesarios pero no suficientes para el desarrollo de neoplasias malignas. Cualesquiera sean las opiniones sobre la capacidad oncogénica de algunos virus en sus huéspedes

naturales, es indiscutible que la utilización de estos virus como trazadores biológicos en modelos experimentales es uno de los métodos más precisos empleados actualmente para conocer mejor la patogenia del cáncer (36).

1.5.5.2 Biología viral.

Los virus son agentes infecciosos carentes de metabolismo propio y, por consiguiente, parásitos intracelulares obligados. En la evolución biológica los virus aparecieron después que las células, lo que explica la íntima relación que tiene la expresión del genoma viral con el metabolismo celular. Básicamente un virus consta de una cierta información genética contenida en su ácido nucleico (ADN o ARN, nunca ambos), cubierta por una estructura polipeptídica, la cápside. Algunos virus adquieren una segunda cubierta, la envoltura, codificada en parte por el genoma viral y mayoritariamente obtenida de alguna de las membranas celulares (ej: plasmática o nuclear). Los virus presentan en su cubierta más externa epitopes que van a reconocer a receptores presentes en la membrana plasmática de la célula blanco. Una vez producida la adsorción del virus a la célula, se produce la penetración y posteriormente la denudación, que sucede cuando el virus pierde su envoltura y su cápside y libera su ácido nucleico en el interior celular. La expresión del ácido nucleico se realiza en dos grandes etapas. En la primera se sintetizan las proteínas tempranas, que intervienen en la replicación del ácido nucleico viral y en la modificación de algunos pasos del metabolismo celular. En la segunda etapa, denominada tardía, las proteínas sintetizadas son estructurales y formarán la cápside. Luego del ensamblaje de nuevos virus, la salida de la célula ocurrirá por brotación a través de las membranas, o por lisis celular.

El ácido nucleico de un virus está organizado de tal forma que con un mínimo de información genética puede sintetizar varias proteínas. Simplificadamente, el genoma de un virus ADN consta, al menos, de un origen de replicación (que es donde el ADN comenzará su duplicación) y de diferentes marcos abiertos de lectura (en inglés, open reading frames u ORFs) que son las secuencias lineales de bases que serán transcriptas en ARN mensajero por una ARN polimerasa celular, y posteriormente traducidas en proteínas. Estas secuencias tienen un extremo denominado 5’ y otro denominado 3’. La transcripción está regulada por varios factores virales y celulares.

Esquemáticamente, existen en el genoma viral fragmentos de ADN denominados promotores localizados hacia el extremo 5' de las ORFs, que regulan la transcripción del fragmento de ADN que se ubica desde ellos hacia el extremo 3'. En algunos virus hay secuencias que en general constan de 70 a 100 pares de bases denominadas enhancers, ubicadas en cualquier parte del genoma viral y en cualquier orientación (de 5' a 3' o viceversa). Sobre los enhancers pueden actuar proteínas celulares o virales haciendo que aumente la eficiencia de transcripción de un gen determinado.

Los virus utilizan frecuentemente 2 estrategias para producir varios péptidos con una misma secuencia lineal de ADN:

- La lectura fuera del marco y
- Los genes superpuestos.

La secuencia de aminoácidos que tendrá una proteína determinada (y por consiguiente su estructura tridimensional y sus funciones biológicas) está codificada por tripletes de bases. Por cada secuencia genética hay 3 marcos posibles de lectura y, potencialmente, la posibilidad de sintetizar 3 diferentes péptidos completamente distintos entre si, tanto en composición aminoácida cuanto en funciones biológicas. Además que el cambio de una sola base puede codificar un aminoácido distinto. Si éste le confiriera a la proteína resultante una nueva propiedad biológica, esta mutación puntual sería crítica para alterar algún paso metabólico celular siendo éste uno de los mecanismos involucrados en la oncogénesis.

Los genes superpuestos se originan de la interrupción de la lectura en diferentes puntos de una misma secuencia genética. Este mecanismo de expresión génica también es utilizado por algunos virus oncogénicos (36).

1.5.5.3 Mecanismos patogénicos comunes a los virus oncogénicos a ARN.

Todos los virus oncogénicos a ARN son conocidos como Retrovirus. Estos virus tienen envoltura y ARN de cadena simple y polaridad positiva (es decir, polaridad de ARN mensajero). La característica común de la familia es la codificación de una enzima multinfuncional, la transcriptasa reversa, que es capaz de transcribir ARN en ADN, alterando de esta forma el "dogma central" que sostenía que la expresión de la información genética celular es

unidireccional: la transcripción del ADN genera moléculas de ARN que sirven para sintetizar secuencias polipeptídicas, concepto que rigió la Biología hasta mediados de la década de 1970 (36).

1.5.5.4 Mecanismos patogénicos comunes a los virus oncogénicos a ADN.

A diferencia de los Retro virus, los virus oncogénicos a ADN no contienen oncogenes con una contraparte celular normal, sino que codifican secuencias propias, distintas de las celulares, pero con capacidad transformante. Se trata de virus exógenos e infectivos, de transmisión horizontal que, una vez que han infectado una célula o un huésped animal susceptible pueden, en ciertas condiciones, desencadenar mecanismos de transformación. Desde el punto de vista de la Patología Experimental son virus extremadamente interesantes, ya que permiten estudiar la relación entre la replicación viral y la capacidad de transformación celular. Entre ellos se encuentran los Adenovirus, Herpesvirus, virus Hepatitis B y Papovavirus.

El común denominador es que pueden producir infecciones líticas, latentes o transformantes, dependiendo del huésped al que infecten. Lo desafiante de esta parte de la Virología es que, desde un punto de vista teórico, la replicación de uno de estos virus en una única célula es excluyente de la transformación celular. Dicho de otra forma, si un virus replica y destruye una célula en cultivo no podrá transformarla y, por el contrario, si la transforma no la lisa. **Fig. 8** Sin embargo, cuando se trabaja con modelos animales se observa que en muchos casos coexisten en un mismo huésped replicación activa y tumorigénesis. Este dilema aun hoy no está aclarado.

Un segundo mecanismo por el cual los virus oncogénicos con ADN pueden transformar a una célula es la inactivación de las proteínas codificadas por los genes supresores de tumores, como son el Rb y la p53. Es el caso de los Adenovirus, cuyas proteínas tempranas E1A y E1B se unen a las proteínas Rb y la p53 respectivamente. De esta forma, al suprimir el efecto biológico de las proteínas supresoras de tumores, estos virus pueden utilizar un segundo mecanismo de transformación celular que, en algunos casos, actuaría en forma sinérgica con la activación anormal de algunos protooncogenes celulares.

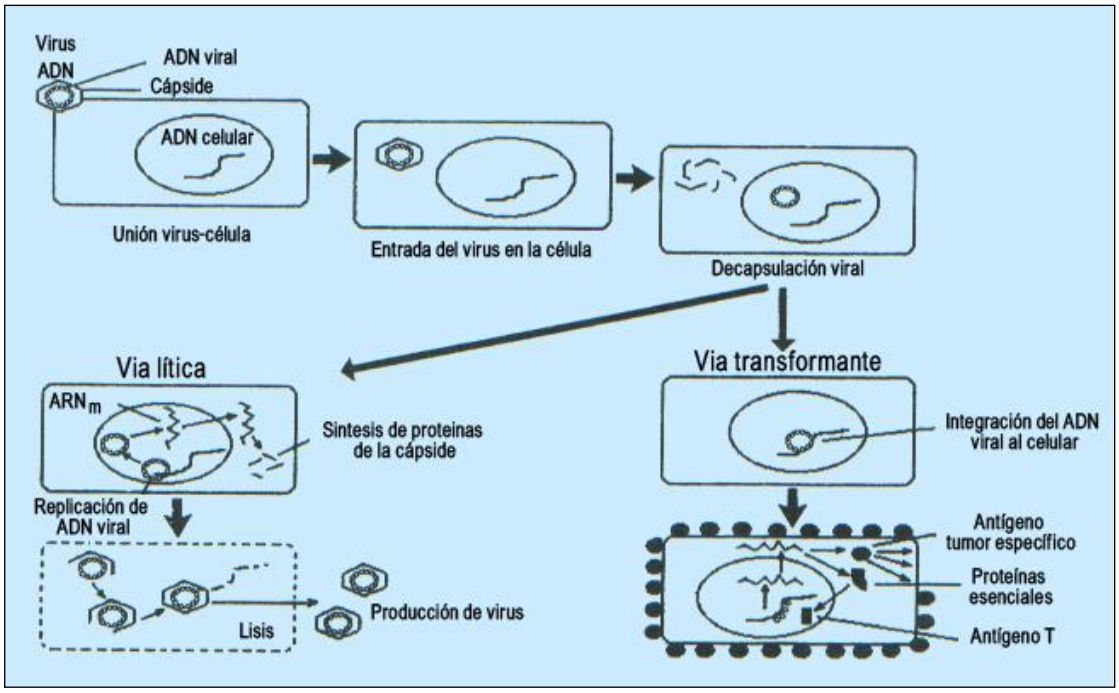


Fig. 8: Representación esquemática de las distintas formas de infección de los virus ADN. Modificado de Bases de Oncología Molecular de Bonfil D, Scharovsky G y col. Ediciones Dunken. 1998.

Los virus oncogénicos no parecen contener información genética para provocar neoplasias *per se*, sino que las producen cuando la célula infectada impide la replicación viral productiva (el caso de los virus con ADN), o cuando, como ocurre con los Retrovirus, adquieren por azar durante su replicación un gen celular que es mutado y transformado en oncogen, o se integran en el genoma celular provocando mutagénesis por inserción (36).

1.5.5.5 Consideraciones básicas sobre algunos virus oncogénicos humanos

En este punto se mencionaran algunos ejemplos de virus humanos asociados a neoplasias.

Virus Papiloma Humano (HPV): la relación entre HPV y carcinomas de cuello uterino fue planteada epidemiológicamente en1975 por zur Hausen (156) y , 10 años más tarde, se clonó y caracterizó el ADN del primer HPV asociado a un carcinoma del cérvix.

La tipificación de los numerosos HPVs conocidos no se realiza por serología sino por la caracterización de los genes virales, siendo tipos 16,18 y 31 los más frecuentes asociados al desarrollo de neoplasias. La asociación de HPV con neoplasias de cuello uterino fue establecida por estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales. Más del 90% de las biopsias de cáncer de cuello uterino contienen ADN de HPV. En las lesiones premalignas el ADN viral se encuentra circularizado y extracromosómico (es decir, en forma episomal), mientras que en los cánceres inducidos por HPV su genoma se encuentra integrado al genoma celular. Este paso parece ser importante en el mecanismo de oncogénesis. Se ha visto que la integración ocurre preferentemente en sectores lábiles de algunos cromosomas denominados sitios frágiles. Muy recientemente se observó que en uno de esos sitios frágiles empleados por el HPV para insertarse existe un gen denominado *fiht*, que actuaría como un supresor de tumores, y que estaría involucrado, además, en la patogenia de varios cánceres no relacionados con HPV, como son los carcinomas de pulmón y de mama. De esa forma, los HPVs podrían actuar suprimiendo a un gen supresor de tumores adicional. Como se vio antes, no sólo proliferación celular sino también el fenotipo maligno depende de la expresión de los oncogenes virales E-6 y E-7, que actúan sobre las proteínas regulatorias p53 y Rb respectivamente. La expresión descontrolada de estos oncogenes en parte está determinada porque la integración del genoma viral al genoma celular ocurre a menudo a través del gen viral E-2 que tiene un efecto regulatorio negativo (represor) sobre la expresión de E-6 y de E-7. Al integrarse, E-2 es delecionado, y en consecuencia no continúa ejerciendo su control normal sobre la expresión de E-6 y E-7.

Se sospecha que no sólo los oncogenes de HPV intervienen en la transformación, sino que están también involucrados algunos mecanismos celulares. Se han detectado proteínas celulares que influencian positiva o negativamente la expresión de E-6 y E-7, y que pueden ser clasificadas como a) citoquinas que actúan como mediadores intercelulares de regulación del genoma viral; b) mediadoras de señales intracelulares y, c) factores de transcripción que controlan la expresión de los promotores y enhancers de HPV (157-159).

Virus Epstein- Barr (EBV): A la conocida asociación epidemiológica y clínica que este virus tiene con el linfoma de Burkitt africano y con el carcinoma nasofaríngeo, se le ha agregado recientemente una probable relación con el linfoma de Hodgkin. La mayor parte de los trabajos que defienden la asociación entre EBV y linfoma de Hodgkin son casuísticas provenientes de por lo menos 8 países con distintos niveles de desarrollo socioeconómico. También se lo relaciona con el linfoma immuno-blástico, el carcinoma linfoepitelial de las glándulas salivales, el linfoma de Hodgkin, la enfermedad linfoproliferativa y al leiomiosarcoma en la infection por HIV pediátrica (157, 158, 160-162).

Virus Herpes 8 (HHV-8): este virus ha sido detectado recientemente en casos de sarcoma de Kaposi. Utilizando una estrategia de detección original y compleja, pudo determinarse que el genoma de este nuevo Herpes tiene regiones homólogas al virus Epstein-Barr y al Herpevirus saimiri. La presencia de este virus ha sido detectado en sarcomas de Kaposi desarrollados en pacientes con SIDA, pero también en la mayoría de todas las formas de sarcomas de Kaposi presentes en pacientes HIV- negativos (Kaposi endémico africano, Kaposi post-transplante, y Kaposi clásico). El virus también fue encontrado en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con SIDA. El hallazgo más interesante acerca de la relación causal entre HHV-8 y el sarcoma de Kaposi consiste en que la detección del virus en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con HIV- positivos predice el desarrollo futuro de sarcomas de Kaposi en estos enfermos. También se lo relaciona con el desarrollo de linfomas primarios, mieloma múltiple y linfoadenopatía angio-inmunoblástica y con la enfermedad de Castleman (160, 161, 163-165).

El **Herpesvirus-6** se ha detectado en la enfermedad linfoproliferativa, en linfomas, en la enfermedad de Hodgkin, y en el carcinoma espinocelular (160, 161, 163, 165-167).

Virus Hepatitis B (HBV): la relación de este virus con el desarrollo de hepatocarcinomas comenzó a sospecharse cuando se observó que las zonas endémicas con HBV (Filipinas, Hong-Kong, Sudáfrica, etc.) presentan una incidencia mucho mayor de hepatocarcinoma que la observada en los países donde la infección de la población con HBV es marcadamente menor. Luego se detectó la presencia de ADN de HBV en la mayor parte de los

hepatocarcinomas. Dado que existen en la actualidad extensas campañas de vacunación contra HBV, se espera que la demostración concluyente acerca de la relación de este virus con hepatocarcinomas ocurra cuando se observe una reducción marcada en el número de hepatocarcinomas entre la población vacunada (36).

1.5.5.6 Características de los Virus del papiloma Humano (HPVs):

Los virus del papiloma humano son una especie viral antigua, que ha co-evolucionado con su huésped, y que no pueden ser propagados en cultivos de tejidos probablemente debido a que requieren de una diferenciación epitelial total para la producción de partículas virales.

Son virus DNA pequeños, epiteliotrópicos, no encapsulados, icosaédricos con 72 capsómeras que rodean al genoma. La cubierta exterior proteica consiste en dos proteínas de la cápside, una mayor y otra menor. La información genética está codificada en un genoma circular de doble cadena que consiste en aproximadamente 8.000 pares de bases.

La organización del genoma viral ha sido bien caracterizada. Toda la información codificada de este virus está localizada en una cadena y la transcripción tiene lugar en una sola dirección (en sentido de las agujas del reloj). El genoma puede ser dividido en tres regiones: una región temprana, una región tardía, y una región controladora. **Fig. 9, Tabla 3.** La región temprana E (del inglés Early: E1- E2- E3- E4- E5- E6- E7- y E8) consiste en aproximadamente 4.500 pares de bases y contiene genes responsables de la replicación del virus, la regulación de la transcripción y la actividad transformadora.

La región tardía L (del inglés Late: L1- L2), consiste en alrededor de 2.500 pares de bases, que contiene los genes requeridos para la síntesis de las proteínas de la cápside.

La región reguladora LCR (del inglés Long Control Region), de alrededor de 1.000 pares de bases, se encuentra entre la región temprana y la tardía y contiene el origen de la replicación viral y los elementos de control para la transcripción y la replicación.

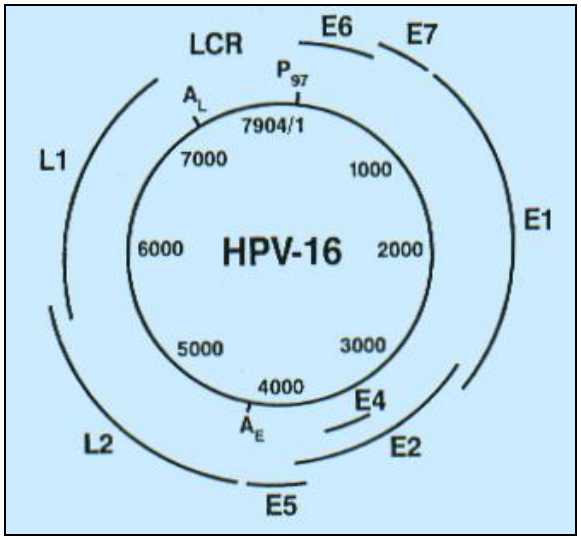


Fig. 9: Mapa del genoma del HPV 16. Los genes se designan E1 a E6 (genes de la región temprana) y L1, L2 (genes de la región tardía). La región controladota (LCR) contienen los elementos que controlan la replicación y la trascripción viral. Modificado de Shah KV and Howley P. Papillomaviruses in Fields Virology, Cap 66. 3° edition Lippincot- Raven Publishers. Filadelfia. 1996.

TABLA 3: Funciones asignadas a las regiones de codificación proteica RCP, en inglés ORFs (168).

RCP	Función
L1	Proteína mayor de la cápside.
L2	Proteína menor de la cápside.
E1	Iniciación de la replicación viral.
E2	Proteína reguladora transcripcional
E3	No se conoce su función.
E4	Proteína tardía; rompe las citoqueratinas
E5	Proteína transformadora de membrana; interactúa con los receptores de los factores de crecimiento
E6	Proteína transformadora; promueve la degradación del p53.
E7	Proteína transformadora; se une al retinoblastoma
E8	No se conoce su función

A la fecha se han identificado más de 90 genotipos de HPVs por análisis de la secuencia del DNA, siendo cada tipo diferente en un 10% en la combinación de secuencias nucleotídicas de los genes E6, E7, y L1.

Distintos tipos de HPVs pueden ser clasificados en grupos basados en su homología en el DNA, y estos grupos tienden a tener un trofismo celular y un potencial oncogénico semejante.

Por ejemplo, de acuerdo a la homología en las secuencias, los tipos de HPVs que infectan el tracto genital pueden ser divididos en varios subgrupos. Los HPVs relacionados al HPV6 - 11, 44 y 55 - se encuentran raramente en carcinomas y son considerados de “bajo grado” de malignidad; mientras que aquellos relacionados al HPV16 - 31, 33, 35, 52, 58 y 67 - y al HPV18 - 9, 45, 59, 68 y 70 - tienen potencial oncogénico y son los denominados de “alto grado”. Igualmente los HPVs encontrados en los pacientes que padecen de Epidermodisplasia Verruciforme se encuentran raramente en individuos normales y forman un grupo de HPVs que están lejanamente relacionados a los tipos genitales/mucosos.

a) Expresión del genoma viral.

La transcripción y la replicación viral están asociados al estado de diferenciación de la célula infectada. En las capas mas profundas del epitelio, donde se encuentran las células basales (las únicas con capacidad de dividirse), sólo se expresan los genes de la región temprana. Estas células no fabrican las proteínas de la cápside codificadas por los genes tardíos y en consecuencia no se producen virus. Los genes tempranos también se expresan en células transformadas. Los genes tardíos, por el contrario, se expresan en las células diferenciadas que se encuentran cerca de la superficie del epitelio. A pesar de que estas células son incapaces de dividirse y por consiguiente están destinadas a morir, su localización provee de un sitio fácilmente accesible para la transmisión viral a un contacto susceptible.

Mecanismos de transformación:

El medio en que algunos tipos de HPV pueden transformar células no ha sido todavía totalmente esclarecido, pero estudios de las décadas pasadas han hecho mucho para avanzar en el entendimiento de este proceso. La mayoría de los trabajos se han hecho en los dos virus más frecuentemente aislados de los carcinomas de tracto genital, el HPV 16 y el HPV 18. Es posible, sin embargo, que no todos los tipos de HPV empleen los mismos mecanismos para inducir la malignidad. En particular, hay alguna evidencia que el HPV 33 transforma las células por otra vía.

Todos los tipos de HPV se replican exclusivamente en el núcleo de la célula huésped. En las lesiones benignas el genoma del HPV está separado del DNA de la célula huésped (episomal) replicándose como un episoma extracromosomal o plásmido. En las lesiones malignas asociadas al HPV 16 y 18 el DNA viral está usualmente integrado en el cromosoma del huésped.

Para poder integrarse al DNA celular es necesario un quiebre en el genoma viral. Esta separación no ocurre en cualquier sitio, por el contrario, la mayoría de las escisiones se encuentran en la región E1/E2. El resultado de esta disrupción parece ser la pérdida de función de estos dos genes acompañada de la desregulación de los genes E6 y E7 que resultan en la transformación celular. El sitio en el genoma en el que el virus se integra no parece ser esencial para la carcinogénesis, ya que éste varía ampliamente.

A pesar de que el E6 y el E7 están fuertemente implicados en la carcinogénesis mediada por HPV, el mecanismo por el cual estos genes causan la transformación celular no está del todo claro. Una posibilidad es que la actividad transformadora del E6 y del E7 sea ejercida a través de interacciones con proteínas celulares que regulan la progresión del ciclo celular. En particular la proteína E6 se une a la proteína p53 y la E7 al producto del gen Rb. Ambas proteínas celulares han sido denominadas “productos de antioncogenes” debido a sus roles en prevenir la transformación celular suprimiendo la división celular y la proliferación. Si estas proteínas celulares están ausentes, mutadas o modificadas y, por lo tanto, no son reconocidas por sus blancos celulares, se producirá la transformación celular. **Fig. 10**

Los HPV son especies remarcadamente específicas para el género humano.

Todos los HPV infectan los epitelios escamosos de la piel o de las mucosas pero distintos tipos de HPV muestran un trofismo característico para distintos tipos celulares.

En general los HPV pueden dividirse en tres categorías:

- Tipo genital.
- Cutáneos no genitales.
- Específico de la Epidermodisplasia Verruciforme (EV), enfermedad cutánea determinada por una susceptibilidad anormal determinada genéticamente a ciertos tipos de HPV y que en el 50% de los casos desarrollan cánceres (169).

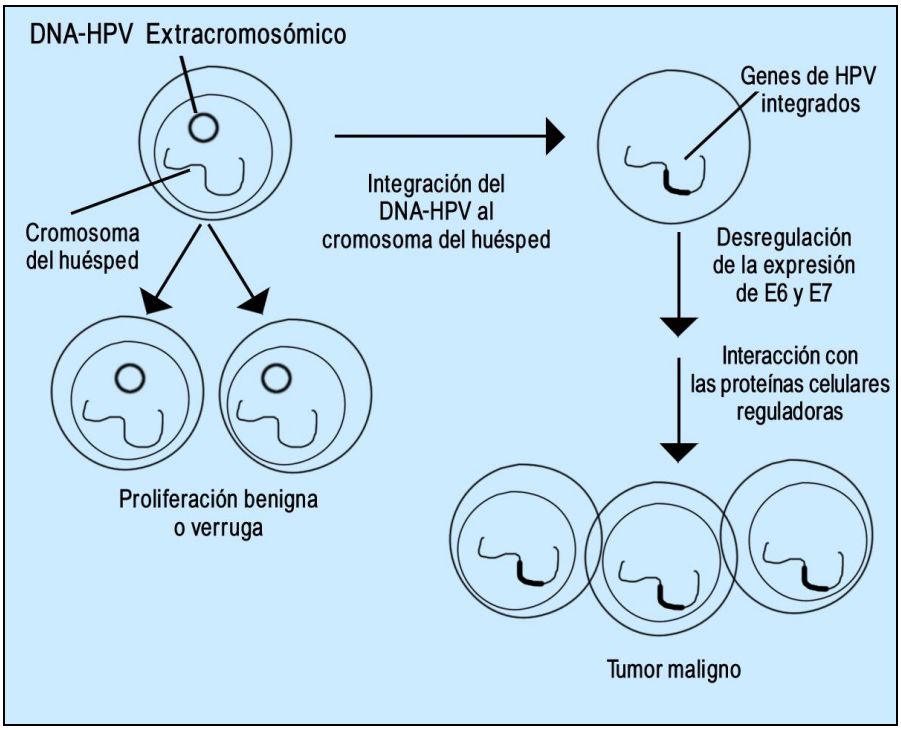


Fig. 10: Modelo de la transformación malignas de las células ocasionadas por los HPV 16 y HPV 18. Adaptado de Human Papillomavirus and Human Disease. Am J Med. 1997; 102(5A):12.

Se piensa que el virión del HPV entra en el cuerpo ante el mínimo trauma del epitelio. La mayoría de las infecciones son asintomáticas pero las lesiones cuando aparecen lo hacen entre el tercer y octavo mes posteriores al contagio. Observaciones recientes, sin embargo, sugieren que el período de latencia viral ha sido subestimado y que las lesiones pueden aparecer años después de la infección (170).

b) Patogénesis y patología.

En general, las verrugas cutáneas son lesiones proliferativas benignas y auto limitantes que pueden resolverse espontáneamente después de un tiempo.

Debido a que sólo las células basales del epitelio tienen el potencial de multiplicación, una verruga resultaría de la infección, transformación y multiplicación de las células basales.

La infección resulta probablemente de una exposición de las células basales a las partículas virales infecciosas luego de traumas menores del epitelio; por

ejemplo, durante el acto sexual o ante traumatismos leves cutáneos y/o mucosos. El virus estimula la proliferación de las células basales iniciando así la formación de una verruga.

Todas las células de una verruga contienen el genoma viral pero la expresión de los genes virales está estrechamente ligada al grado de diferenciación celular. En la capa de las células basales tiene lugar una infección no productiva episomal donde se llegan a formar hasta 200 copias con gran amplificación del genoma. Sólo las capas más diferenciadas del epitelio son permisivas para la síntesis proteica de la cápside, la replicación del DNA viral vegetativo y el armado de viriones. Así es que, las partículas virales y los antígenos de la cápside se encuentran en las capas más superficiales del epitelio. La infección persiste en las células basales porque ellas no sufren cambios, no hay coilocitosis ni lisis celular.

Los hallazgos característicos en las verrugas son los cambios nucleares: agrandamiento, hipercromacia, degeneración y picnosis.

A pesar de que la infección con HPVs resulta en la proliferación celular, las células en que se produce la multiplicación viral terminan diferenciándose y no son más competentes para la división celular.

La coilocitosis es un hallazgo característico a muchas verrugas y fue primeramente descrito como una anormalidad en la displasia del cuello de útero.

EL término “atipia coilocítica” fue introducido por Koss y Durfee en 1956 (171) para describir lesiones del cuello de útero que estaban caracterizadas microscópicamente por grandes células epiteliales, con un núcleo relativamente pequeño e irregular que estaba rodeado por un halo claro glicógeno negativo (172). Ellos designaron a estas células como coilocitos, significando con este término “células vacías”.

Actualmente se sabe que los coilocitos son patognomónicos de la infección por HPV y que esas anormalidades celulares representan el efecto celular letal de la reproducción viral (173,174).

Combinada a otros hallazgos como la acantosis, la disqueratosis y la multinucleación de los queratinocitos, la presencia de coilocitos ha sido usada como una evidencia, a nivel de la microscopía óptica, de infección por HPV (175).

A pesar de que la atipia coilocítica acompañada de anormalidades nucleares son los criterios diagnósticos más importantes para la infección por HPV, las partículas virales o los antígenos virales son detectados sólo en una pequeña proporción de las células afectadas.

En los humanos, el efecto de la infección por HPV está confinado al epitelio pero la proliferación fibroblástica es un hallazgo prominente en algunos fibropapilomas de animales.

c) HPV y Cáncer

Sólo algunos de los varios tipos HPVs que infectan las diferentes especies podrían tener un rol oncogénico.

El intervalo de tiempo entre la infección inicial y el desarrollo de carcinomas invasores puede ser largo, en el caso de los tumores en el tracto genital puede ser de varias décadas.

Se requieren de cofactores para la progresión a la malignidad. Por ejemplo, los cánceres de piel en la Epidermodisplasia Verruciforme se ven más en las lesiones expuestas al sol.

El rol de los cofactores y el largo periodo de latencia en el desarrollo de carcinomas relacionados a HPVs son consistentes con el punto de vista ampliamente aceptado de que la carcinogénesis es un proceso de múltiples pasos. Por ejemplo, el HPV podría aumentar el promedio de vida celular y eventos adicionales (mutación celular, activación de la oncogénesis, inactivación de las proteínas supresoras tumorales) contribuirían a la transformación maligna.

Los cánceres relacionados al HPV no son uniformes respecto al estado del genoma viral. Por ejemplo, en el carcinoma cutáneo de la EV, los genomas virales están presentes extra cromosómicos (episomal). Por el contrario, los genomas HPV 16 y 18 están frecuentemente integrados al genoma celular en los carcinomas del tracto genital (168).

d) Respuesta inmune.

Muchas observaciones clínicas y patológicas han resaltado la importancia de la respuesta inmune, especialmente las de las células T en determinar el curso de la infección por HPVs. Se han descrito verrugas más numerosas y de mayores tamaños cuando está deprimida la función inmunológica - embarazo, terapia inmuno- supresora, transplante de órganos e infección por VIH - y

desaparecen cuando se reduce o elimina la inmunosupresión. Así en un estudio realizado entre 1996 y1997 detectamos la presencia de genomas de HPV por medio de la hibridización in situ - técnica de baja sensibilidad - en los tejidos obtenidos por biopsia de agrandamientos gingivales inducidos por ciclosporina en pacientes transplantados renales, encontrando una prevalencia del 92.31% (12/13) y el 91.7% de las muestras presentaron coilocitosis (176).

La anatomía patológica de una verruga cutánea en regresión muestra una infiltración por células mononucleares, sugiriendo así una respuesta inmune mediada por células. La extirpación de una verruga o el trauma sobre la misma frecuentemente resulta en la regresión de las verrugas de otros sitios sugiriendo una respuesta inmunológica gatillada por la liberación de un antígeno desde la verruga.

e) Latencia y persistencia.

Tanto los papilomas laríngeos como los genitales recurren frecuentemente después de periodos libres de enfermedad. Estudios virológicos han demostrado que la recurrencia está relacionada a presencia del genoma viral en células de apariencia normal adyacentes a los tejidos papilomatosos. En la mayoría de las mujeres que tienen HPV en el tracto genital se dice que el virus está clínicamente latente en aquellas mujeres que no tienen anormalidades clínicas ni citológicas. A pesar de que el ADN viral está presente en menores cantidades en las mujeres HPV positivas que son citológicamente normales que en las que tienen patología relacionada al HPV, no hay diferencias consistentes ni cualitativas entre estos dos grupos con respecto al patrón de la transcripción viral. En las infecciones por HPV no ha sido posible distinguir claramente la latencia de la persistencia con un bajo nivel de replicación viral (168).

f) Clínica e histología.

Las infecciones por HPV en cavidad bucal son etiológicamente heterogéneas y son difíciles de categorizar sobre la base de criterios clínicos e histológicos (177). En lesiones de cavidad bucal se han aislado 16 genotipos de HPVs: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35, 57 (178).

La mayoría son genotipos de “bajo riesgo”, están relacionados a lesiones proliferativas benignas - papiloma escamoso, condiloma acuminado, verruga vulgar, hiperplasia epitelial focal y tienen un pequeño potencial de

transformación maligna. En contraste, los genotipos de HPVs de “alto riesgo” (16, 18, 31, 33, 35) tienen un alto potencial de transformación maligna y están frecuentemente asociados a la displasia epitelial y al carcinoma espinocelular en diferentes sitios anatómicos incluyendo la cavidad oral (179).

Las lesiones provocadas por los HPVs son hiperplasias epiteliales que pueden ser únicas o múltiples, pediculadas o sesiles, y se pueden localizar en cualquier sitio de la cavidad bucal.

Las lesiones pediculadas son:

Papiloma escamoso: que son mayormente tumores únicos. Se discute si son entidades distintas a los condilomas acuminados.

Condilomas acuminados: que pueden ser únicos o múltiples y que se presentan como lesiones exofíticas de color rosado, formada por múltiples elementos digitiformes y no cornificadas. Histológicamente tienen un epitelio escamoso estratificado con proyecciones papilares sostenidas por un corazón de tejido conectivo fibroso vascular.

Verrugas vulgares: semejantes a los anteriores pero de color blanco y aspecto seco debido a la marcada cornificación.

Los estudios virológicos sugieren que, con excepción de la hiperplasia epitelial focal, casi todas las lesiones de la mucosa bucal están asociadas a los HPVs del tracto genital. En contraste, el HPV2 se ha identificado en las verrugas de la semimucosa del labio pero infrecuentemente en las verrugas vulgares de la mucosa bucal. **Tabla 4.**

Las **lesiones sesiles** no están claramente descriptas en la literatura y se presentan como lesiones blancas brillantes de aspecto húmedo y ligeramente elevadas, similares a las lesiones planas reveladas por el ácido acético en cuello de útero.

Fornatora M y colab (180) en un estudio publicado en 1996 describen lesiones similares y las consideran un subtipo de displasia epitelial oral que tiene características clínicas e histológicas únicas y que tendría un valor predictivo de la presencia de DNA de HPV.

Otra lesión proliferativa producida por el virus del papiloma humano es la Hiperplasia Epitelial Focal que es una condición clínica bien caracterizada y que está asociada a los HPV 13 y 32, los únicos HPVs que parecen infectar exclusivamente a la cavidad bucal. Esta entidad fue por primera vez descripta

en 1894 por Helms según lo publicado por Praetorius y Clausen (181) en esquimales de Groenlandia. Desde entonces ha sido observada en varios grupos étnicos indígenas del Norte, Centro y Sur de América (182-185). Se da especialmente en la primera y segunda década de la vida, afecta con predilección a las mujeres, presentándose como múltiples lesiones proliferativas de aspecto condilomatoide que se localizan especialmente en la mucosa oral no cornificada de labios, carrillos y bordes de lengua. Si bien está relacionada a la infección con los HPVs 13 y 32, se destacan como factores predisponentes importantes la malnutrición, la predisposición genética, la mala higiene y las precarias condiciones de vida (186).

Los estudios virológicos sugieren que, con excepción de la hiperplasia epitelial focal, casi todas las lesiones de la mucosa bucal están asociadas a los HPVs del tracto genital. En contraste, el HPV2 se ha identificado en las verrugas de la semimucosa del labio pero infrecuentemente en las verrugas vulgares de la mucosa bucal.

Tabla 4: Principales manifestaciones clínicas de los HPV genitales y otros tipos que afectan a las mucosas. (187)

Manifestación clínica – Tracto genital	**Genotipo viral**
Infección subclínica	Todos los tipos de HPV.
Condiloma exofítico (en cualquier localización)	HPV-6, -11.
Condiloma plano (especialmente en el cérvix)	HPV-6, -11,- 16, -18,- 31 y otros.
Papulosis bowenoide	HPV-16
Condiloma gigante	HPV-6, 11.
Cáncer del cérvix	HPV-16,- 18,- 31,- 45. Muy relacionados HPV-35, -39, -51, -52, -56, -58, -59, -63 y otros tres sin denominación. Medianamente relacionados. HPV-6,- 11,- 26,- 42,- 43,- 44,- 53, -54, -55, -62, -66 y otros dos sin denominación. Con baja o ninguna relación.
Cáncer vulvar	HPV -16
Cáncer peneano.	HPV -16
Papilomas respiratorios	HPV -6, -11
Papilomas conjuntivales	HPV -6, -11
Manifestación clínica- Cavidad bucal	**Genotipo viral**
Hiperplasia epitelial focal	HPV- 13, -32
Infecciones con HPVs del tracto genital	HPV- 6, -11, -16 y -18
Lesiones del labio (verrugas planas)	HPV-2

El HPV puede no sólo infectar mucosa sana sino también aquellas lesiones cancerizables mencionadas con anterioridad, las leucoplasias, los líquenes y las eritroplasias, estas últimas consideradas por algunos autores como carcinomas *in situ* primitivos (60).

Al presente no hay publicación referida a alguna manifestación clínica particular de estas lesiones que podría hacer presumir la infección con virus del papiloma humano.

g) Métodos convencionales para el diagnóstico de la infección por HPV

Muchas de las técnicas usadas para diagnosticar otras infecciones virales no han sido exitosas para el diagnóstico del HPV ya que este virus no crece en medios de cultivo.

Los mejores métodos deben tener tanto una buena sensibilidad -capacidad de identificar correctamente a las personas enfermas- como una alta especificidad - habilidad de identificar correctamente las personas que no tienen la enfermedad. Otras cuestiones deseables son el bajo costo y la simplicidad del método (188).

Dentro de los métodos de diagnósticos utilizados a la fecha tenemos:

g.1 Observación clínica.

La infección por HPV puede producir lesiones características, fáciles de identificar - las verrugas-; otras lesiones extendidas en superficie - blancas acantósicas- más difíciles de detectar pero en mayoría de los pacientes infectados no hay lesiones visibles aparentes. En la ausencia de manifestaciones clínicas es difícil de detectar la infección por HPV.

g.2 Citología e histología.

El método más común de testeado citológico es el PAP, en el cual células exfoliadas del tracto genital se tiñen y examinan buscando coilocitosis y neoplasia. Aún cuando el hallazgo de coilocitosis es virtualmente diagnóstico de infección por HPV, muchos de los tejidos infectados, especialmente aquellos con infecciones latentes no muestran signos de células coilocíticas (189). Así es que a pesar de que la especificidad del PAP es de aproximadamente del 90% la sensibilidad es pobre; sólo entre el 15 y el 50% de los pacientes infectados son identificados por el PAP (190).

Así como las características citológicas, los hallazgos histológicos dependen del estadio de la infección. Las infecciones productivas tipificadas como

condilomas presentan papilomatosis, paraqueratosis y acantosis. También se observan frecuentemente disqueratosis, multinucleación y binucleación.

g.3 Pruebas serológicas.

Aún cuando hay disponible algunas pruebas serológicas, éstas son pocos sensibles e inespecíficas (191).

g.4 Métodos de detección del DNA del HPV.

Hay muchos tipos de pruebas para la detención del DNA del HPV, cada una con sus propias fortalezas y debilidades. Un paso clave en todos estos procedimientos es una reacción de hibridización en la cual un ácido nucleico específico para el DNA del HPV se une al DNA de la muestra patrón. Bajo condiciones apropiadas, las sondas se lavan separándose de las muestras que no contienen DNA de HPV pero se mantendrán unidas las que sí la posean. Las pruebas varían según la preparación de las células que son las fuentes del DNA, la preparación de la muestra del DNA y la forma en que se usa la sonda.

g.4.1 Aislamiento del material genético y enzimas de restricción.

Un clon molecular es un conjunto de fragmentos de ADN idénticos, derivado de un fragmento de ADN definido. La clonación molecular, entonces se puede asemejar a la obtención de múltiples fotocopias de ADN a partir de una única secuencia de ADN original. Para ello, es necesario aislar, en primer lugar, el fragmento de ADN de interés del resto del material genómico. La extracción y purificación de los ácidos nucleicos se pueden realizar por diferentes métodos. Muchos de ellos involucran:

- Digestión con proteasas, que quita las proteínas pegadas al ADN e inactiva las nucleasas que podrían degradarlo.
- Extracción orgánica con fenol, para eliminar las proteínas remanentes y generar una fase que contiene el ADN.
- Precipitación del ADN con etanol.
- Disolución del ADN en agua tamponada.

El primer paso en la clonación molecular involucra el uso de enzimas de restricción que cortan la molécula de ADN en una serie de fragmentos. El segundo paso incluye la introducción del fragmento de ADN en **vectores** (plásmidos, bacteriófagos, cósmidos) que permiten amplificarlo para obtener la cantidad suficiente como para manipularlo.

El trabajo realizado por las enzimas de restricción consiste en el reconocimiento de una secuencia nucleotídica de ADN concreta para realizar allí un corte y generar así una serie de fragmentos. Muchas enzimas cortan dejando extremos cohesivos o pegajosos que pueden volver a unirse entre sí o con cualquier otro segmento de ADN por medio de enzimas denominadas ADN ligasas. El uso de enzimas de restricción y ligasas constituye la base de toda tecnología del ADN recombinante o ingeniería genética (193).

g.4.2 Hibridización; reacciones.

Las moléculas de ADN o ARN pueden existir como moléculas de cadena simple o de cadena doble. Dados un pH, temperatura y concentración salina apropiados, se pueden formar dúplex de ácidos nucleicos estables entre moléculas de ARN o ADN de cadena simple complementarias. El apareamiento de dos hebras complementarias es semejante a un mecanismo de llave y cerradura en el sentido de que sólo habrá apareamiento si hay una complementariedad de bases. El término “hibridización” se utiliza para describir todos los tipos de formación de dúplex sin tener en cuenta el origen de las hebras de ADN en cuestión. Se ha denominado desnaturalización, disociación o fusión a la separación de las dos hebras del ADN dúplex en dos moléculas de cadena simple. La desnaturalización es la contra parte de la formación de dúplex y es promovida por alta temperatura, alto pH o bajas concentraciones de cationes. Este proceso no es irreversible, dado que las hebras complementarias forman de nuevo una doble hélice en determinadas condiciones de temperatura (renaturalización o hibridización del ADN). Pueden hibridizar dos cadenas complementarias, sean ellas ADN:ADN, ADN:ARN o ARN:ARN. El fragmento de ADN de una sola hebra (que suele “marcarse” con un isótopo radioactivo o con biotina), utilizado en experimentos de hibridización para detectar secuencias específicas de nucleótidos, se denomina sonda (en inglés, probe).

Hay varios factores que afectan las reacciones de hibridización: temperatura, concentración de cationes (Na+), concentración de ADN, longitud de los fragmentos, pH, tipo de ADN, y cantidad de bases no apareadas (mismatches) entre el ADN blanco y la sonda. Modificando estas condiciones uno puede modificar la rigurosidad (stringency) de la reacción permitiendo la hibridización

de moléculas perfectamente complementarias (alta rigurosidad) o bien de moléculas con un porcentaje menor de homología (baja rigurosidad).

Los ensayos de hibridización consisten en la unión de la sonda y el ADN complementario a detectar. Es por esto que la construcción de las sondas constituye una parte importante de esta metodología. Se pueden usar sondas de ADN o ARN. El procedimiento más usado para la construcción de sondas radioactivas o no radioactivas es el proceso denominado “nick translation” o desplazamiento del corte. Primero se introducen múltiples cortes en el dúplex de ADN a marcar mediante la digestión controlada con una enzima denominada ADNasa I. Luego se agrega la ADN pol I que además de la función de polimerasa tiene una función de exonucleasa, o sea que, además de agregar, puede quitar nucleótidos. Lo que hace la pol I es ir degradando la cadena de ADN a partir de ese corte o nick y, al mismo tiempo, va agregando nucleótidos. Si en la reacción agregamos tres deoxinucleótidoss fríos (no radioactivos) y uno marcado con ^{32}P, la nueva cadena que se sintetizará estará marcada.

En el caso de sondas radioactivas, la detección se logra usando una película radiográfica en la cual aparecerán manchas oscuras donde hubo emisión radioactiva.

En muchos casos, para evitar los problemas que trae aparejado el uso de material radioactivo se usan sistemas no isotópicos como la biotina. Las sondas se marcan con biotina en una reacción de *nick translation* semejante a la descripta, sólo que en este caso uno de los nucleótidos estará biotinilado. La sonda biotinilada es hibridizada con el ADN blanco que puede estar inmovilizado en un filtro o directamente en células o tejidos en un portaobjetos. La presencia de los híbridos se detectan con fosfatasa alcalina o peroxidasa conjugada a estreptavidina (la estreptavidina tiene la capacidad de unirse a la biotina), enzimas que luego se detectarán por una reacción de color in situ ante la presencia del sustrato apropiado en determinadas condiciones. La fosfatasa alcalina reacciona con 5-Bromo-4-Cloro-3-indolil fosfato y Nitro Blue Tetrazolium como cromógenos y la peroxidasa usa el agua oxigenada para convertir a la diamino-bencidina-níquel en un compuesto coloreado. Los métodos de detección no radioactivos tienen varias ventajas sobre los métodos

radioactivos: son más fáciles de manipular, tienen una vida útil más larga y no requieren métodos especiales para guardarlos y descartarlos (192).

g.4.2.1 Reacciones de hibridización en soporte sólido.

En 1975 E. Southern (193) describió un método para transferir el ADN de una electroforesis en gel de agarosa a un filtro de nitrocelulosa. Esta ventaja revolucionó el estudio de los ácidos nucleicos y es uno de los métodos más sensible y específicos de hibridización.

Mediante el uso de esta técnica se detectan e identifican genes individuales entre los casi 28.000 genes que componen el genoma humano.

El procedimiento es el siguiente: el ADN total es extraído y se digiere con enzimas de restricción. Como hay $3x10^9$ pares de bases en el genoma haploide humano, la digestión enzimática produce una mezcla compleja de fragmentos de distintos tamaños. Los fragmentos digeridos son separados por medio de una electroforesis en gel de agarosa. La distancia que migra el ADN es inversamente proporcional al logaritmo del peso molecular (PM). El ADN es entonces desnaturalizado en el mismo gel sumergiéndolo en una solución de hidróxido de sodio y luego es transferido a una membrana de nitrocelulosa o nylon por capilaridad. El ADN se une así irreversiblemente al filtro y es analizado. El análisis se lleva a cabo incubando el filtro con una sonda de ADN de cadena simple marcada radioactivamente, homóloga al ADN de interés. La sonda formará un híbrido estable con el ADN homólogo del filtro. Cuando finaliza la hibridización el filtro se lava para remover el exceso de sonda marcada, se seca y se lo expone junto a una película sensible a la radioactividad (generalmente una película radiográfica). De esta forma la radiación del ^{32}P proveniente de sonda ennegrece la película en los sitios donde la emisión se produce. Este proceso se denomina autorradiografía. La presencia de una banda indica la existencia de DNA de HPV, por ejemplo. Usando sondas que se fijan específicamente al DNA de un tipo de HPV, se puede determinar el tipo de HPV presente en la muestra estudiada (194).

Una alternativa, como se mencionó antes, consisten utilizar sondas biotiniladas detectadas a través de reacciones enzimáticas.

g.4.2.1.1 Hibridización in situ.

Esta técnica permite la detección y localización de secuencias nucleotídicas específicas directamente dentro de una célula aislada o un tejido. La

hibridización de ARNm permite estudiar la expresión de un gen único dentro de una célula. La hibridización de ADN permite localizar un gen en un cromosoma. A su vez, es posible estudiar la etiología de una enfermedad mediante la detección de secuencias virales específicas dentro de las células o tejidos.

Se utiliza también para estudiar material histológico especialmente tratado. El blanco son los ácidos nucleicos localizados dentro de las células. Estas se permeabilizan a la sonda mediante tratamiento con proteinasa K. El ADN celular es desnaturalizado con álcali o calor y se hibridiza con las sondas radioactivas o biotiniladas que luego se detectan respectivamente por autorradiografía o con sistemas enzimáticos que ante la presencia de determinados sustratos producen una reacción que da una señal colorimétrica.

Este método tiene la ventaja de localizar las células infectadas. Sin embargo, es menos sensible que el Southern Blot o e Dot Blot, ya que puede detectar sólo las infecciones virales que se expresan pero no las infecciones latentes; además este método no revela el tipo de DNA de HPV presente (192).

g.4.2.1.2 Dot blot.

El Dot blot es un método rápido para analizar muestras para ver, por ejemplo, la presencia de secuencias virales. Se omite la digestión enzimática y la electroforesis. El ADN o ARN extraído se desnaturalizan por calor o álcali, se aplica directamente a un filtro y se fija con calor. Luego el análisis es semejante al del Southern, con la diferencia de que, en vez de dar un patrón de bandas de diferente peso molecular, aquí sólo se obtiene una mancha (del inglés dot) si es que la sonda en cuestión reconoce en la muestra sembrada la secuencia buscada. Es un método rápido pero puede haber falsos positivos. En el Southern Blot la electroforesis presenta un paso extra de purificación del ADN. Además, un patrón de bandas conocido es un dato más que puede confirmar un resultado positivo.

g.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa o **PCR** (del inglés, polymerase chain reaction) es un método para amplificar enzimáticamente secuencias específicas de ADN in vitro mediante ciclos repetidos de desnaturalización, apareamiento, y síntesis de ADN.

En esa técnica, **Fig. 11**, primero se obtiene la separación de las dos cadenas complementarias de los fragmentos de ADN (desnaturalización), obtenidos por

enzimas de restricción, mediante el calentamiento del material entre 80 y 95º C. Luego se agregan en exceso oligonucleótidos sintetizados químicamente de 15 a 25 bases (cebador o primer) que son complementarios a los segmentos 3' de los extremos del fragmento de ADN: la molécula de ADN se mantiene desnaturalizada pero los primers se hibridizan con el comienzo de cada una de sus dos cadenas, delimitando así la región a amplificar. Cada uno de esos dos primers iniciales constituye, de hecho, el comienzo de una nueva hebra de ADN. A continuación, se baja la temperatura de la reacción a alrededor de 60ºC y, en la presencia de deoxinucleótidos, actúa una ADN polimerasa termoresistente obtenida de la bacteria Thermus aquaticus, que vive en aguas termales. Dicha enzima, que funciona eficientemente hasta los 72ºC y se llama Taq polimerasa, permite que se continúe prolongando la cadena iniciada por los primers agregando los nucleótidos complementarios a cada una de las hebras del mismo tiempo, siendo leídas ambas en sentido contrario. Como resultado de ello, se ha duplicado el número de copias de los oligonucleótidos inicialmente flanqueados por los primers. Llegado este momento, se calienta nuevamente la muestra para reiniciar otro ciclo de síntesis y desnaturalización

Cada ciclo de síntesis genera productos de ADN que son copias de una secuencia específica de ADN, y estos productos se transforman en sustratos en nuevos ciclos de síntesis, de allí el nombre de reacción en cadena. Como los productos de la reacción se acumulan exponencialmente, la concentración del ADN se duplica en cada ciclo. Entonces después de 20 ciclos, por ejemplo, la concentración del ADN que se desea amplificar puede exceder a la del no amplificado en un factor de 2^{20}, es decir más que un millón de veces más (192).

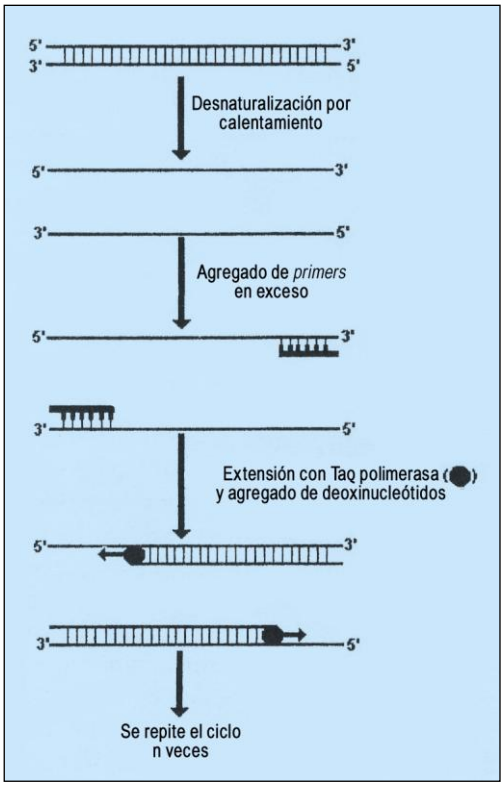


Fig. 11: Representación esquemática de un ciclo de la reacción de PCR. La reacción ocurre en el sentido de las flechas desde la separación de las dos hebras de DNA hasta la síntesis de nuevo DNA duplicando su cantidad en cada ciclo y aumentándolo así exponencialmente. Modificado de Bases de Oncología Molecular de Bonfil D, Scharovsky G y col. Ediciones Dunken. 1998.

Luego el DNA ampliado puede ser sometido a electroforesis o ser visualizado por medio de la utilización de bromuro de etidio o por medio de la detección de una sonda marcada.

El tipo de HPV detectado depende del primer usado. Los primers consensus se hibridizan a una secuencia de nucleótidos comunes al HPV, de tal manera se pueden detectar varios tipos de HPVs, mientras que los primers tipo específicos pueden detectar el tipo de HPV involucrado.

La técnica de PCR permite detectar y analizar cantidades muy pequeñas de ácidos nucleicos. Este ensayo se usa como un método de diagnóstico mucho más sensible que los previamente existentes y resulta en una mejor posibilidad de tipificar los HPVs. Así en una comparación de las técnicas de PCR vs Southern Blot, la PCR fue capaz de tipificar el 75% de las muestras determinadas HPV positivas por el Southern Blot pero no tipificadas (195).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El diagnóstico de la infección por virus del papiloma humano es un campo en evolución. Aún cuando la clínica, la citología y la histología siguen siendo fundamentales para el diagnóstico de infección por HPV, las pruebas a base de la detección del DNA de HPV han aumentado las posibilidades de diagnóstico, estudio y seguimiento de la enfermedad. Hasta la actualidad, en la Ciudad de Córdoba, sólo se han realizado estudios detección de HPV en lesiones cancerosas de cavidad bucal por medio de la hibridización in situ (197) que, si bien tiene una mayor especificidad y además permite identificar el tipo de HPV presente en la lesión y por consiguiente conocer el grado de oncogenicidad del mismo, sigue siendo ésta una técnica de mediana sensibilidad. Por el contrario, la técnica de reacción en cadena de la polimerasa PCR- Southern Blot, según se expresó anteriormente, permite con alta sensibilidad y especificidad la detección e identificación de los distintos tipos de HPVs aún con pequeñas cantidades de muestra como las obtenidas por citología exfoliativa. Por tal motivo se procedió inicialmente a poner a punto esta técnica cuyos resultados se presentaron en el transcurso de las V Jornadas de Biología (Tucumán 1998).

Numerosos trabajos acerca de la detección y tipificación de HPVs mediante PCR han sido publicados hasta el presente pero ninguno ha establecido una correlación sistematizada entre la presunción clínica e histológica de infección viral y el resultado virológico en lesiones precancerosas y cancerosas de la mucosa bucal así como tampoco, en nuestro país, se han analizado los resultados según el sitio de toma (enfermo vs sano) ni se ha correlacionado la presencia de HPVs con otros factores presumiblemente co-carcinogénicos que no sean el tabaco y el alcohol.

Dada la morbilidad y la mortalidad ocasionada por el cáncer bucal consideramos que identificar los tipos específicos de HPVs presentes en lesiones cancerizables y cánceres de la cavidad oral utilizando técnicas de recolección del material atraumáticas, teniendo en cuenta las manifestaciones clínicas particulares atribuibles a la infección viral, y correlacionarlo con otros factores probablemente co-carcinogénicos permitiría tener un valor pronóstico

del curso clínico de la lesión y contribuir al manejo adecuado del paciente infectado, especialmente, cuando aún es posible actuar sobre variables susceptibles de ser modificadas y así prolongar la sobrevida de los enfermos.

OBJETIVOS

- Objetivo general:

Correlacionar distintos factores locales aceptados como posiblemente oncogénicos con la presencia de lesiones cancerizables y cáncer bucal.

- Objetivos específicos:

- Detectar y tipificar genomas de HPV 6, 11, 16 y 18 en mucosa normal, en lesiones cancerizables y en cánceres bucales mediante la técnica de PCR SOUTHERN BLOT.
- Correlacionar la presunción clínica de infección con HPVs con los resultados obtenidos por PCR.
- Correlacionar la presunción histológica de infección con HPVs con los resultados obtenidos por PCR.
- Correlacionar la presunción clínica con la presunción histológica de infección con HPVs.
- Comparar los dos métodos utilizados para la obtención del material: citología exfoliativa y biopsia.
- Comparar los resultados de dos sitios de obtención de material biológico: lado enfermo y el contra-lateral sano.

PRINCIPALES HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

La detección y tipificación de los genomas de HPV por medio de las técnicas de PCR-Southern- blot puede realizarse obteniendo muestras por raspado de las lesiones o de la mucosa normal del paciente afectado orientándose en la presunción clínica por el hallazgo de acantosis, vegetaciones y/o verrugosidades; y en la histopatología por la presencia de coilocitos.

En las lesiones precancerosas y cancerosas de la cavidad bucal existe una correlación positiva entre la infección con HPV, la infección con cándida y el microtraumatismo crónico con los ya conocidos factores carcinogénicos, tabaco y alcohol.

Capítulo II

Materiales y Métodos

2.1 Población bajo estudio.

Esta investigación fue realizada en sesenta y tres individuos inmuno-competentes y de ambos sexos que presentaron mucosa normal (grupo control) o lesionada (grupo problema) concurrentes la Cátedra de Estomatología "B" de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba. El estudio se realizó bajo los delineamientos éticos de la declaración de Helsinki-Tokio, con consentimiento informado al paciente.

El **grupo problema** se conformó con 33 pacientes, masculinos n=21 y femeninos n=12, con unas edades promedio de 57-58 años y con un rango de edad de entre 27-83 años. Todos presentaron al examen estomatológico lesiones cancerizables o carcinomas de la mucosa bucal. Éstas incluyeron leucoplasias y líquenes determinados según los criterios la Organización Mundial de la Salud (73,198) y las clasificaciones de Grinspan-Abulafia (57) y cánceres del tipo papilomatosis floridas o carcinomas verrugosos y carcinomas espinocelulares (6,199,200). Todas las lesiones diagnosticadas clínicamente fueron confirmadas por medio del estudio histopatológico realizado por el mismo anátomopatólogo.

El **grupo control** se conformó por 23 sujetos, masculinos n=7 y femeninos n=16, con una edad promedio de 38 años, con un rango de edad de entre 8 a 72 años, que tenían una mucosa bucal de apariencia normal que también fue confirmada histopatológicamente.

Por otra parte, se incluyeron 7 sujetos con verrugas y condilomas acuminados a fin de establecer un **grupo control de infección por HPV.** **Fig 12.**

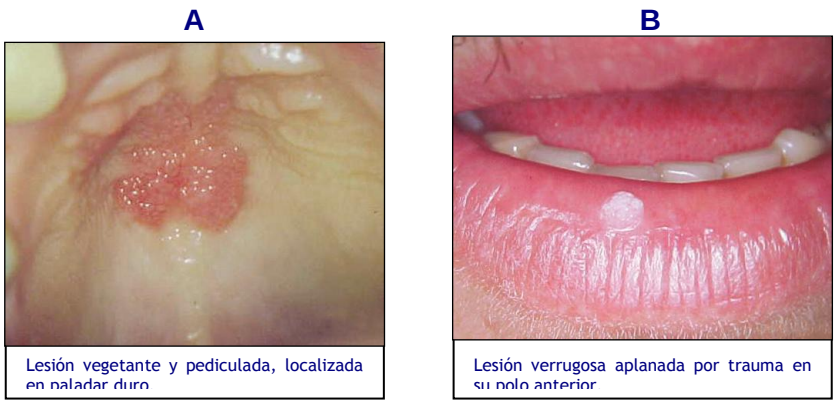


Fig. 12: A Condiloma Acuminado, **B** Verruga vulgar.

Los datos se registraron mediante una Historia clínica ad-hoc:

PROTOCOLO PARA DETECCION Y TIPIFICACION DE HPVs POR PCR:

. Nº de orden…….
. Apellido y Nombres:……
. H.C:……..
. Edad:……
. Sexo: Femenino……Masculino:……..
. Estado Civil:……..
. Ocupación:……
. Dirección: …….
. Tel:……
. Fecha inicio:……
. Diagnostico presuntivo:……
. Tiempo de evolución:……
. Presunción clínica de H.P.V.:
(SI)……(NO)……..
. Material enviado:
T (Tejido)…… C (Células)…….
. Biopsia:…… Fecha:……./……/…… Conservación:……..
. Sitio preciso de toma:……
. Citología de la lesión:…… Fecha:……/……/……
. Método de obtención:…… Conservación:……..
. Sitio preciso de toma:……
. Citología de mucosa sana:…… Fecha:……/……/……
. Método de obtención:…….…… Conservación:
. Sitio preciso de toma:……
. Esquema (localización).

MATERIAL PARA CITOLOGÍA E HISTOLOGÍA CONVENCIONAL:

. Biopsia:……... Fecha:……/……/……. Fijador:……
. Sitio preciso de toma:……..
. Citología de la lesión:……... Fecha:……/……/……. Fijador:……
. Método de obtención:……...
. Sitio preciso de toma:……
. Citología de mucosa sana:…… Fecha:……/……/…….
. Método de obtención:……... Fijador:……
. Sitio preciso de toma:……

RESUMEN DE HISTORIA CLINICA:

. Antecedentes generales:……

……

……

. Hereditarios:……

……

……

. Tabaco:……

. Alcohol:……

. Antecedentes locales:……

. Factores micro-traumatizantes:……

. Candidasis:……

. Estado periodontal:……

. Higiene: ……

. Antecedentes terapéuticos: ……

. Anatomía patológica previa:(SI)…… (NO)…… Fecha:…../…../……..

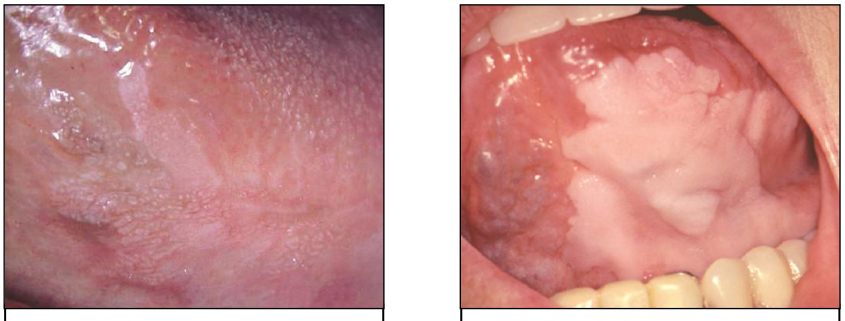
. N ° de entrada:……

. Resultado: ……

. Coilocitosis:(SI)…… (NO)……

2.2 Criterios clínicos diagnósticos.

Infección con HPVs: Se consideró presunción clínica de infección a las lesiones blancas translúcidas dispuestas en forma de mancha, puntiformes o en parches que denominamos **acantosis** y aquellas francamente vegetantes o verrugosas llamadas **vegetación y verrugosidad** respectivamente (180). **Fig 13**



Lesión acantósica translúcida con tenue puntillado en cáscara de naranja.

Lesión acantósica blanca brillante con mayor espesor y puntillado en cáscara de naranja.

Fig. 13: Lesiones acantósicas **A**: Paciente Nº 32. **B**: Paciente Nº 24.

Infección con cándida: La presunción clínica de infección con cándida se determinó en el examen clínico mediante:

- la presencia de lesiones blancas de aspecto cremoso que se desprenden total o parcialmente al raspado.
- lesiones rojas provocadas por hipotrofia y/o atrofia epitelial o por eritema.

Estas manifestaciones, a veces planas o con tendencia vegetante, únicas o múltiples, pueden asentar sobre mucosa de aspecto normal o en afecciones preexistentes tales como las leucoplasias, los líquenes y los carcinomas incluidos en el estudio (57). **Fig 14.**

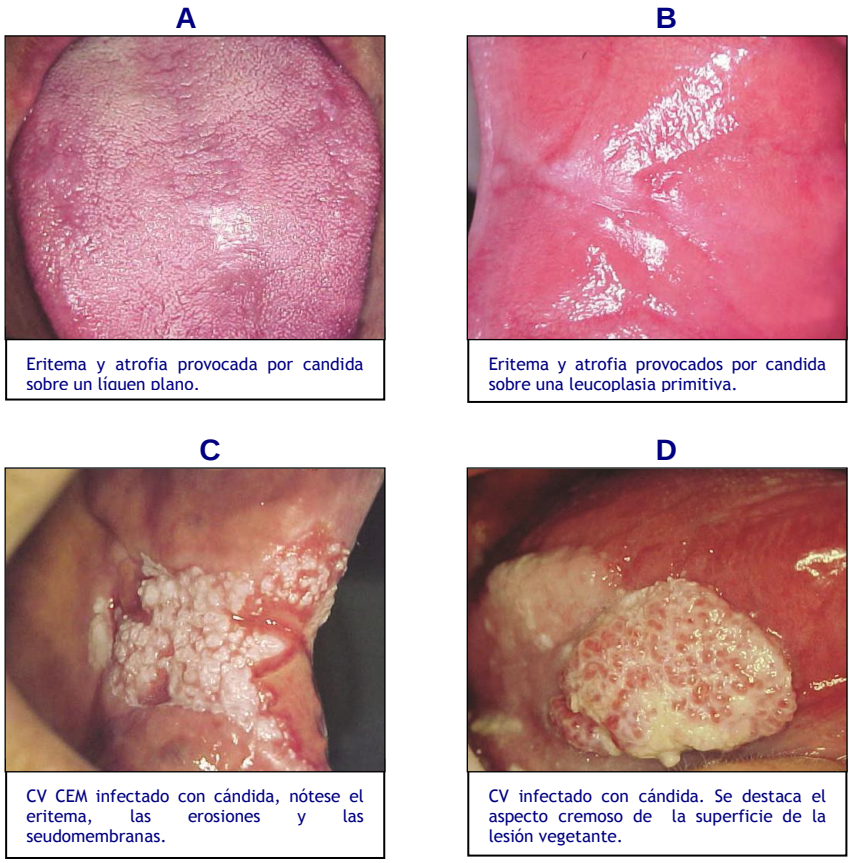


Fig. 14: Lesiones potencialmente malignas y malignas infectadas con cándida. **A**: Paciente Nº 32. **B**: Paciente Nº 21. **C**: Paciente Nº 11. **D**: Paciente Nº 2.

Microtraumatismos crónicos: se definieron de este modo a aquellas irritaciones que, a la manera de una lija, dañan la mucosa bucal, en forma suave pero constante, por un tiempo prolongado. **Fig 15.**

Dentro de los factores capaces de ocasionarlos podemos mencionar:

- Bordes cavitarios de dientes con caries.
- Obturaciones desbordantes y/o mal pulidas.
- Dientes íntegros en mal posición.
- Prótesis desadaptadas o sus elementos de fijación.
- Hábitos traumatizantes funcionales o para funcionales.

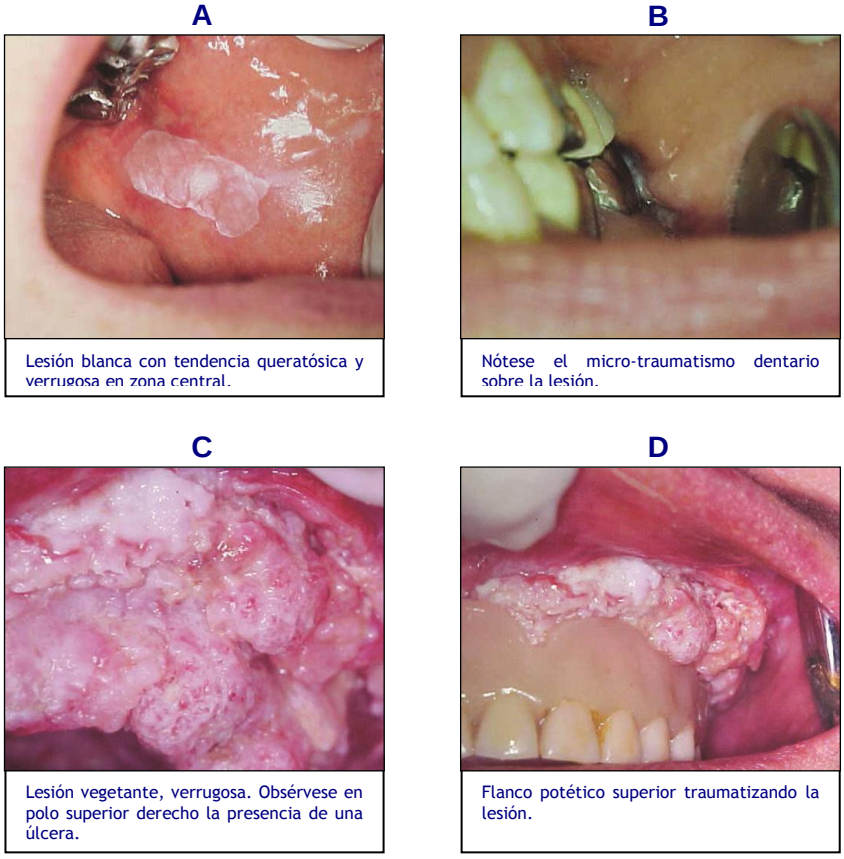


Fig. 15: Micro-traumatismos crónicos sobre lesiones potencialmente malignas y malignas. Paciente Nº 22. **A:** Leucoplasia secundaria, **B:** Acción traumática dentaria. Paciente Nº 4. **C:** Carcinoma verrugoso y epidermoide micro-invasor, **D:** Acción traumática protésica.

2.3 Citología Exfoliativa y Biopsia.

El material biológico de los casos se obtuvo por raspado y por biopsia de la lesión y por raspado de la mucosa contra-lateral sana. La técnica del raspado se realizó mediante espátulas metálicas esterilizadas en calor seco a 260° C por 2 horas. Por otra parte, se seleccionó la mucosa contra-lateral por ser homóloga en su estructura histológica, por ejemplo, grado de queratinización, ya que es esperable que a mayor grado de cronificación se encuentre menor cantidad de DNA celular y viral.

El material biológico de los controles se obtuvo por raspado y por extirpación de la mucosa sana suprayacente o adyacente a lesiones benignas especialmente quistes mucoides e hiperplasias fibrosas.

Cada sitio seleccionado fue raspado 5 veces y se tomó especial cuidado en evitar la contaminación cruzada entre las muestras obtenidas de diferentes lugares. La punta de la espátula se sumergió en 2.5 ml de una solución salina de buffer fosfato (PBS) a pH 7.5 que luego fue congelada a -80ºC. Los raspados se realizaron a cada uno de los sujetos estudiados para realizar el análisis de PCR-Southern blot y para el diagnóstico citológico.

Todos los tejidos obtenidos por biopsia se dividieron en dos porciones, una para el análisis de PCR-Southern blot que fue congelada a -70°C y la otra para el examen histopatológico.

2.4 Análisis Citológico e Histopatológico

Los extendidos para el análisis citológico se fijaron con etanol al 96% y se tiñeron con la técnica de Papanicolau. El material para el estudio histopatológico se fijó en formol al 10%, se incluyó en parafina y se coloreó con hematoxilina-eosina. La evaluación de ambos resultados se realizó a doble ciego. El hallazgo de coilocitos (201) en los estratos intermedios y superficiales del epitelio escamoso plano estratificado de la mucosa bucal se consideró indicativo de presencia del HPV, así como también se tomó en consideración el hallazgo de células binucleadas (202). **Fig 16.**

Estos datos fueron analizados a doble ciego por una anátomo-patóloga especializada en citología y previamente calibrada en infecciones por HPV en cuello de útero.

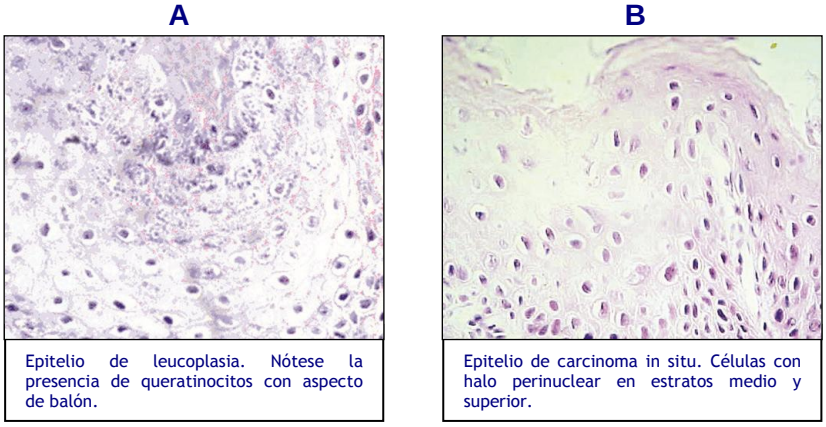


Fig. 16: Presencia de coilocitos en preparados histopatológicos. **A:** Paciente Nº 25. **B:** Paciente Nº 9.

2.5 Aislamiento del DNA.

El material obtenido por raspado y el tejido desagregado de las biopsias se descongeló y se centrífugo a 3000 rpm durante 5 minutos para sedimentar las células; el sobrenadante fue descartado y el precipitado se lavó 2 veces con "buffer"estéril TE (10 mM Tris, pH: 8.3, EDTA 1 mM). Posteriormente el precipitado se disolvió a 150μl de Tris 10mM pH 8.3, 0.45% Tween-20; 0.45% Nonidet P-40 y 200μg/ml de Proteinasa K, y se incubó a 55º C por una hora para el material obtenido por raspado y toda la noche los tejidos obtenidos por biopsia. La proteinasa K fue desactivada a 95º C por 15 minutos. Luego, el DNA fue purificado por medio de la extracción con fenol-cloroformo y precipitado con etanol y cloruro de sodio (203). El DNA purificado fue disuelto en 50μl de buffer TE y guardado a –20º C.

2.6 PCR del genoma de HPV.

Diferentes volúmenes de cada una de las muestras fueron utilizados como molde con el cebador o *primer* L1 consensus en un volumen final de 50 µl bajo las siguientes condiciones: buffer 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 3 mM $MgCl_2$, 300 μM dNTPs, 1μM de primer $GP5^+$ (5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'), 1μM de primer $GP6^+$ (5'-GAAAAATAAACT GTAAATCATATTC-3') (204) y 2 unidades de Taq polimerasa.

La PCR se realizó con el siguiente esquema de amplificación: un inicio a alta temperatura, 94°C, desnaturalización a los 95°C por 45 segundos, hibridación a 55°C por 45 segundos, extensión a 72°C por 45 segundos; seguido por 5 minutos de extensión final a 72°C. Dos controles negativos fueron incluidos en cada experimento, como controles positivos se usaron 100 μg de plásmido que contienen DNA de HPV-6 o de HPV-11 (cedidas amablemente por el Dr. E.M. De Villiers, Heidelburg, Alemania), y 500 pg de DNA Caski o DNA Hela, éstas son líneas células humanas derivadas del carcinoma de cuello de útero que se saben infectadas con HPV y que son portadoras de HPV 16 y de HPV 18 respectivamente, (205,206). La PCR fue realizada en un Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT, USA), y los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles nativos del poliacrilamida al 6.5% (207). A los fines de eliminar la posibilidad de contaminación y de artefactos de PCR, para cada ensayo de PCR-Southern blot se hicieron por lo menos tres controles negativos que contenían todos los componentes de las reacciones, excepto el DNA problema (207).

2.7 Southern Blot

Los productos de PCR fueron analizados por medio de la electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. Luego, el gel fue desnaturalizado en NaOH de 0.5 M, 1.5 M NaCl por 15 minutos, neutralizado dos veces en 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH=8, y enjuagados durante la noche sobre una membrana de nylon (Biodyne tipo A, Gibco BRL) en 10X SSC (NaCl 1.5 M, dihidrato del citrato de sodio 0.15 M). La membrana fue saturada dos veces por 15 minutos en 2X SSC en el 1% SDS, fijada con luz ulravioleta por 1 minuto, horneada a 80° C por 30 minutos, y pre-hibridizada 55°C por 45 minutos en una solución que contiene: 6X SSC, solución de 5X Denhardt, 0.1% SDS y 100μg/ml de esperma de arenques (Calbiochem). La membrana posteriormente fue hibridizada a 55°C por 1 hora en la misma solución suplida con sondas biotiniladas con oligonucleótidos específicas de HPV:

MY12: 5' - CATCCGTAACTACATCTTCCA-3', MY13:5'

TCTGTGTCTAAATCTGCTACA3', sonda para 16:5'

GTCATTATGTGCTGCCATATCTA CTTCAGA-3', sonda para 18:5' TGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCA-3' (208,209).

Después de la hibridación, las membranas se lavaron y se realizó la detección de las sondas con el conjugado Streptavidina-fosfatasa alcalina usando la versión 2.0 Photogene Nucleic Acid Detection System (Gibco BRL), según la recomendación del fabricante.

Los controles positivos y negativos fueron incluidos en todos los Southern blots. Los controles positivos del Southern blot fueron los controles positivos de la PCR hibridizados con la sonda correspondiente, por ejemplo el DNA de HPV 11 fue hibridizado con la sonda de HPV 11; por el contrario, los controles negativos fueron hibridizados con una sonda de un genotipo distinto de HPV, por ejemplo el DNA de HPV 11 fue hibridizado con las sondas para HPV 6, 16 y 18.

2.8 PCR del gen de la β-globina

Para descartar un efecto inhibitorio, se realizó para cada espécimen un PCR con cebadores específicos de β-globina:

PCO3 (5'- ACACAACTGTGTTCACTAGC-3') y

PCO4 (5'-CAACTTCATCCACGTTCACC-3') (211).

Las condiciones de PCR fueron las descritas para los primers generales GP5+/GP6+ salvo que se utilizaron 0.5 μM de cada uno de los cebadores, PCO3 y PCO4.

2.9 Cuantificación del DNA

Para cuantificar el DNA se siguió el sistema de cuantificación de DNA humano ACES 2.0 (manual de instrucción - Gibco B.R.L). El DNA, a partir de la 0.5, 1, 5, 10, 100 y 1000, de células Caski o de Hela fueron cuantificados para utilizar como estándares. Las biopsias y los especímenes citológicos de los raspados que fueron negativos para PCR--Southern blot estuvieron también sujetos a la cuantificación del DNA.

2.10 Análisis Estadísticos

Los datos clínicos fueron descriptos mediante frecuencias absolutas o frecuencias relativas, estas últimas expresadas en porcentajes y se utilizó como medida de centralización la mediana.

Las variables género, trauma, presencia de HPV, presencia de candidiasis, tabaco y alcohol, registrados en la historia clínica, fueron evaluadas como variables nominales con dos o tres niveles –categorías-. Para cada categoría se establecieron puntos de corte para cada variable **Tabla 5.**

Para evaluar homogeneidad de proporciones para cada una de las variables clínicas estudiadas se aplicó la prueba de Chi Cuadrado con un grado de libertad y se fijó el valor $p<0.05$ para rechazar *Ho: las proporciones son iguales.*

La evaluación de la precisión de cada técnica aplicada en la identificación de la presencia de HPV fue realizada con la prueba de McNemar, que analiza cambios en la categoría de respuestas bivariadas en datos apareados, fijándose el valor $p<0.05$ para identificar cambios significativos en las proporciones estudiadas. Además, se aplicó el coeficiente de concordancia de Kendall's W que mide la correspondencia entre cada observación cuyo rango varía entre 0, falta de concordancia, y 1, concordancia completa (210).

Para analizar asociaciones entre las variables clínicas y la presencia de HPV se utilizó el Análisis de Correspondencia, técnica multivariada exploratoria que representa las asociaciones en un espacio reducido con respecto al original (211).

Tabla 5: Categorización de variables estudiadas.

VARIABLES CLÍNICA	CATEGORÍA
Fumar* (127)	**1**: consumo diario mayor o igual a 5 cigarrillos por más de 5 años. **0**: consumo diario menor a 5 cigarrillos.
Alcohol* (127)	**1**: ingesta diaria > 1L de vino o su equivalente por más de un año. **0:** ingesta diaria menor a 1L de vino o su equivalente.
Trauma	**1**: presencia; **0:** ausencia
HPV	**1**: presencia; **0:** ausencia
Candidiasis	**1**: presencia; **0:** ausencia
Género	**1**: femenino; **0:** masculino
Edad	**1:** < 40 años; **2:** 40-60 años; **3:** > 60 años

*El corte se decidió en base a las características de la muestra.

Los datos fueron analizados con los softwares Infostat/profesional versión 2007p y SPSS 12, 2003.

Capítulo III

Resultados

3.1 Caracterización de la población estudiada.

Los datos biodemográficos de los casos y controles se muestran en la **Tabla 6 y 7.**

El grupo problema se conformó con 33 pacientes de los cuales fueron de género masculino 21 (64%) y femenino 12 (36%) con edades promedio de 57-58 años y con un rango de edad de entre 27-83 años. El grupo *control* se conformó por 23 sujetos, 7 (30%) masculinos y 16 (70%) femeninos con una edad promedio de 38 años, con un rango de edad de entre 8 - 72 años. Por otra parte, en el *grupo control de infección por HPV* se incluyeron 7 sujetos, 3 (47%) varones y 4 mujeres (53%) con edades promedio de 34-35 años y un rango entre 6 – 65.

Las lesiones pre-malignas estudiadas incluyeron leucoplasias (primarias y secundarias) y líquenes atípicos (queratóticos, erosivos y atróficos). Las lesiones malignas incluyeron carcinomas verrugosos y carcinomas espinocelulares micro-invasores e invasores. **Fig. 17.**

En relación a la edad de los pacientes se observó, en un porcentaje significativamente mayor (p=0.048)*, la presencia de carcinomas en individuos con edades superiores a 65 años. **Fig. 18.**

Teniendo en cuenta el género en relación al diagnóstico confirmado es destacable mencionar que el mayor porcentaje significativo (p=0.019)* de lesiones cancerosas se presentó en los individuos de sexo masculino. **Fig. 19.**

* Prueba para igualdad de proporciones mediante Método de Monte Carlo, basado en 10000 tablas muestrales comenzando con la semilla 926214481.

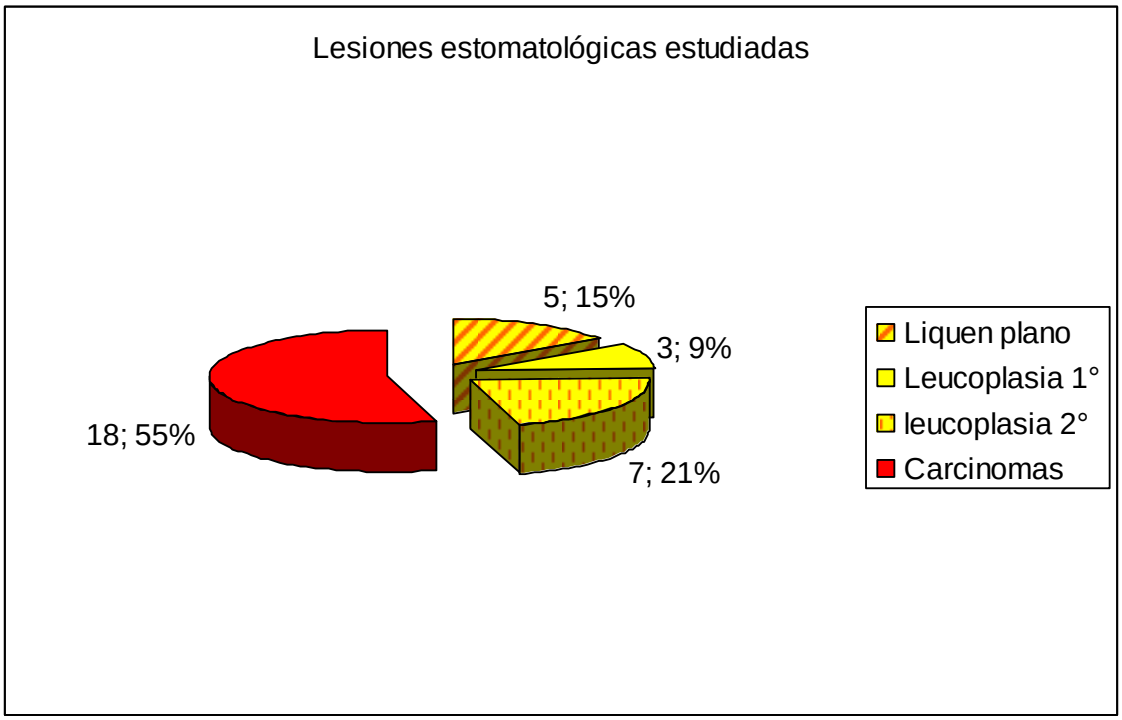


Fig.17: Frecuencia absoluta y porcentaje de lesiones observadas en la población bajo estudio.

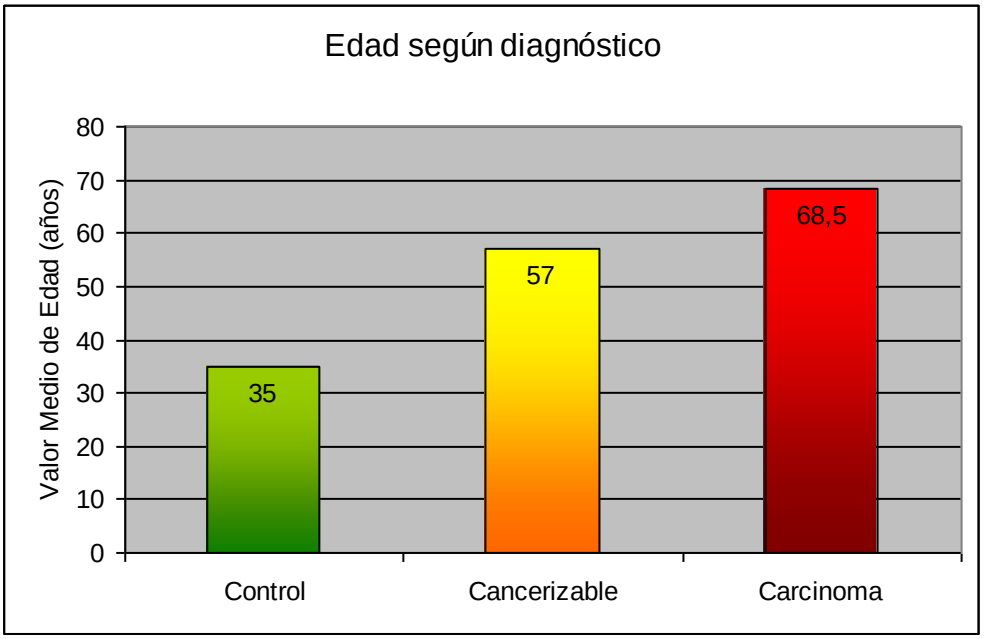
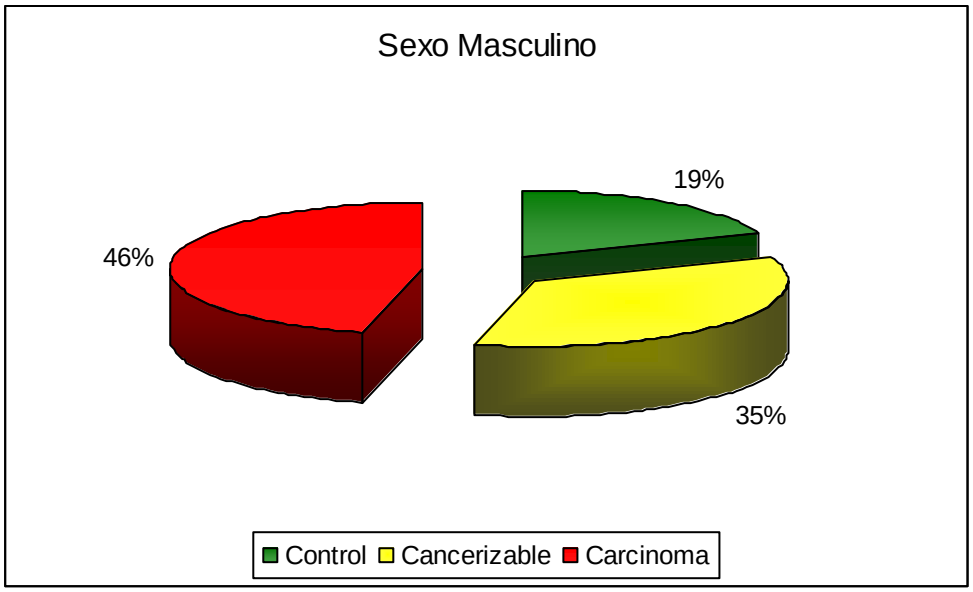


Fig.18: Valor medio (mediana) de la edad en años de los sujetos involucrados en el estudio.

A



B

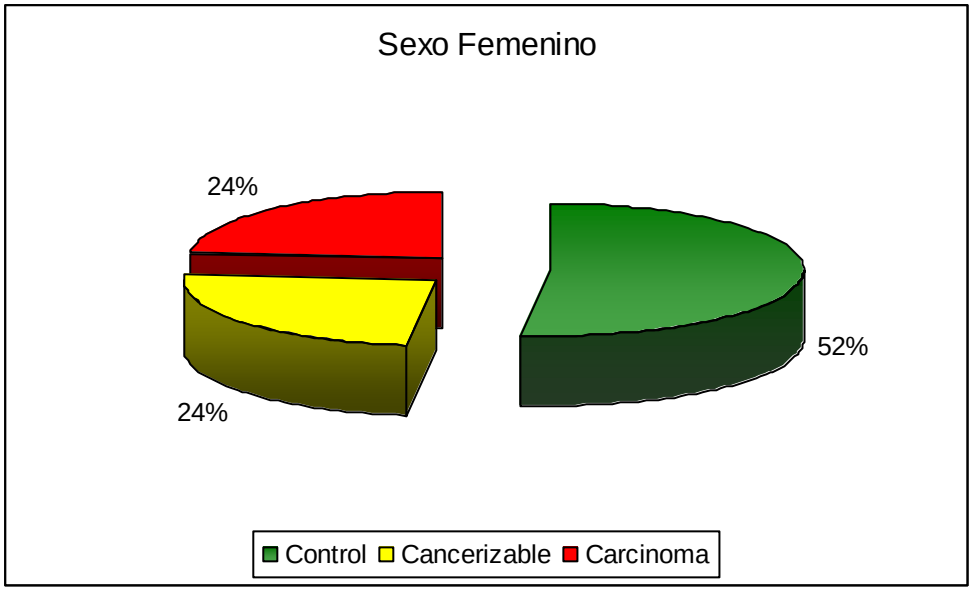


Fig.19: Porcentaje de sujetos según género que presentaron lesiones o fueron controles.
A: Sexo masculino*, **B:** Sexo femenino.

3.2 Detección de genomas de HPV por medio de la PCR- Southern blot.

A los fines de tipificar los genotipos de HPV 6, 11, 16 y 18 en pacientes con lesiones orales pre-malignas y malignas, se implementó la amplificación del genoma de HPV por medio de la PCR seguida por la prueba de Southern blot usando los cebadores generales (*primers*) $GP5^{+}/GP6^{+}$ (23), con sondas específicas para los genotipos 6, 11, 16 y 18 tal como se describió en Material y Métodos. En la Figura 4 se muestra un ejemplo de un Southern blot para HPV 18.

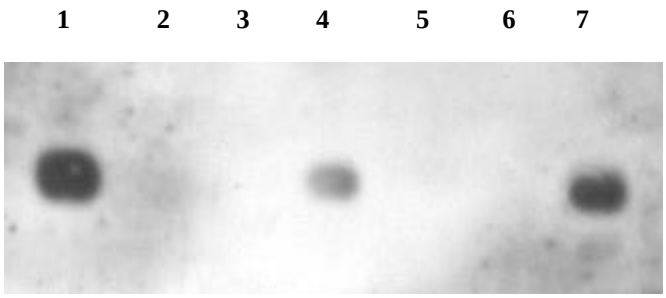


Fig.20: Detección del genoma de HPV 18 por medio de las técnicas de PCR - Southern blot. Los carriles 1, 2, 3, 4 y 5 corresponden a los pacientes 3, 6, 10, 19 y 20 respectivamente. El carril 6 es un control negativo, y el 7 corresponde al DNA de Hela (HPV 18 positivo).

3.2.1. Métodos de recolección de las muestras: Citología versus biopsia.

En la **Tabla 6** se muestran la detección de genomas de HPV obtenida por PCR - Southern blot en el tejido y en las células de 22 casos.

Con el propósito de la evaluación de una técnica no invasora para la detección-tipificación de HPVs que podría ser utilizada en el seguimiento de los pacientes con lesiones cancerizables y cánceres bucales, se compararon los resultados de las citologías obtenidas por raspado de la mucosa bucal con lesiones potencialmente malignas y malignas y se las compararon con los resultados de las biopsias de las mismas y con las del contra-lado clínicamente normal. La detección de HPV no difirió estadísticamente entre las citologías de la mucosa de las lesiones y las del contra lado clínicamente normal ($p>0.05$), pero sí hubo una diferencia significativa, en la detección de HPV, entre las

biopsias y las citologías obtenidas por raspado ya sea de la lesión o de la mucosa normal ($p < 0.05$).

Teniendo en cuenta que la sensibilidad del método de PCR-Southern blot establecida para las células Hela es de alrededor de 0.155 pg de DNA, es de destacar que el valor medio del DNA encontrado en las biopsias fue de 14 ng, siendo éste de 4 a 2000 veces más alto que el valor medio del DNA de las citologías que resultó ser de sólo 0.27 ng.

En relación a los métodos de recolección de las muestras y a la evaluación por PCR de la presencia de HPV, es notable observar que el 95-100% de los casos en que el material se obtuvo por el raspado de la mucosa, resultaron positivos a HPV, mientras que sólo el 45% de los casos fueron positivos a HPV en las muestras obtenidas por biopsia. **Fig. 21.**

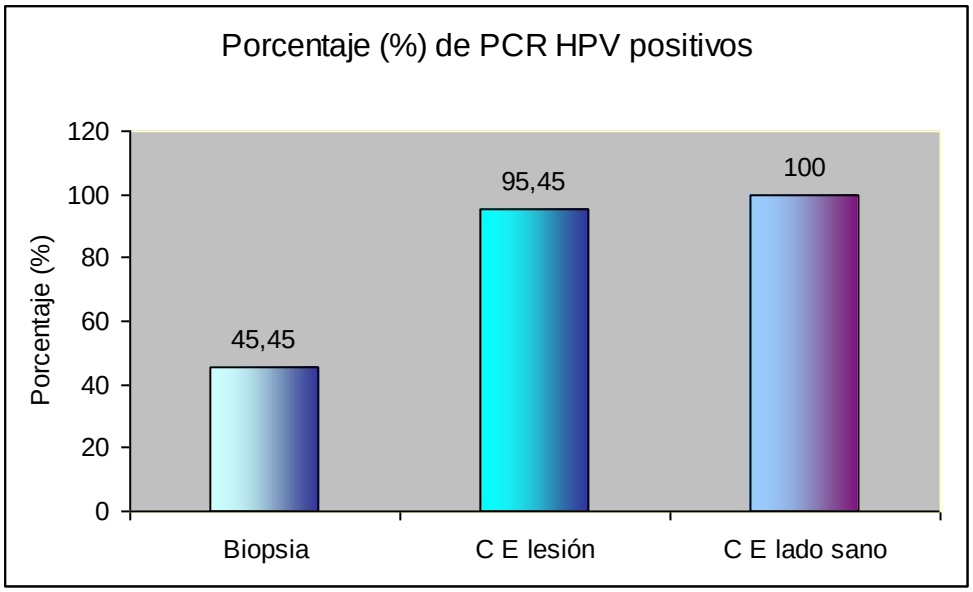


Fig. 21: Porcentaje de muestras positivas la detección de HPV según el método de obtención de la muestra: *CE lesión*: citología exfoliativa de la lesión, *CE lado sano*: citología exfoliativa de la mucosa bucal clínicamente sana, del lado opuesto a la lesión.

Tabla 6: Detección de genomas de HPV 6, 11, 16 y 18 en muestras de biopsia y de células obtenidas por raspado de la mucosa lesionada y de la contra-lateral sana.

PACIENTE	DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO	GENOTIPOS DE HPV		
		BIOPSIA	CITOLOGÍA EXF. (mucosa lesionada)	CITOLOGÍA EXF. (mucosa sana)
1	CEM	16	16	16
2	CV	16-18	16-18	16-18
3	CEI	16-18	16-18	16-18
4	CV, CEM	Negativo	6-16-18	*
5	Liquen Plano queratótico	11	11-16	11-16
6	Liquen Plano queratótico	16	16	16
7	Leucoplasia 2ª	Negativo	16-18	16-18
8	CEI	16	16	16
9	CIS	Negativo	11-16	11-16
10	CEI	Negativo	16	16
11	CV, CEM	*	*	16
12	CV, CEI	Negativo	Negativo	18
13	Liquen Plano queratótico	Negativo	*	*
14	CE microinvasor	Negativo	11	*
15	Liquen Plano queratótico	Negativo	*	*
16	CEI	Negativo	16	16
17	Leucoplasia 1ª	Negativo	*	*
18	CEI	Negativo	*	*
19	CV	11	18	18
20	CEI	11	11	11
21	Leucoplasia 1ª	Negativo	11	*
22	Leucoplasia 2ª	Negativo	11	*

*genotipo de HPV no determinado. CEM Carcinoma espinocelular microinvasor. CV Carcinoma verrugoso. CEI Carcinoma espinocelular infiltrante. CIS Carcinoma *in situ*. EXF Exfoliativa.

Tabla 7: Resultados de la presunción clínica (lesión elemental asociada a la patología principal), de la presunción histológica (coilocitosis) y el resultado de PCR en la citología de la lesión.

PACIENTE	DIAGNÓSTICO HISTOPATOL.	LESIÓN ELEMENTAL	PRESUNCIÓN CLÍNICA	COILOCITOSIS	CITOLOGÍA LESIÓN
1	CEM	Acantosis	Positiva	Negativa	16
2	CV	Ac Vg Vr	Positiva	Positiva	16-18
3	CEI	Úlcera	Negativa	Negativa	16-18
4	CV, CEM	Ac Vg Vr	Positiva	Positiva	6-16-18
5	Liquen Plano	Queratosis	Negativa	Negativa	11-16
6	Liquen Plano	Queratosis	Negativa	Negativa	16
7	Leucoplasia 2ª	Queratosis	Negativa	Positiva	16-18
8	CEI	Úlcera	Negativa	Negativa	16
9	CIS	Acantosis	Positiva	Positiva	11-16
10	CEI	Vegetación	Positiva	Positiva	16
11	CV, CEM	Ac Vg Vr	Positiva	Positiva	*
12	CV, CEI	Ac Vgr V	Positiva	Positiva	Negativo
13	Liquen Plano	Queratosis	Negativa	Positiva	*
14	CEM	Acantosis	Positiva	Negativa	11
15	Liquen Plano	Queratosis	Negativa	Negativa	*
16	CEI	Úlcera	Negativa	Positiva	16
17	Leucoplasia 1ª	Queratosis	Positiva	Negativa	*
18	CEI	Úlcera_Ac	Positiva	Negativa	*
19	CV	Verrugosidad	Positiva	Positiva	18
20	CEI	Úlcera	Negativa	Negativa	11
21	Leucoplasia 1ª	Acantosis	Positiva	Positiva	11
22	Leucoplasia 2ª	Acantosis	Positiva	Positiva	11
23	Leucoplasia 2ª	Acantosis	Positiva	Positiva	16-18
24	Liquen Plano	Acantosis	Positiva	Positiva	18
25	Leucoplasia 2ª	Verrugosidad	Positiva	Negativa	*
25	Leucoplasia 2ª	Queratosis	Negativa	Negativa	16-18
27	Leucoplasia 2ª	Ac_ Queratosis	Positiva	Positiva	*
28	Liquen Plano	Ac_ Queratosis	Negativa	Negativa	*
29	Leucoplasia 1ª	Ac_ Queratosis	Positiva	Positiva	11
30	Leucoplasia 2ª	Ac_ Queratosis	Positiva	Negativa	11
31	CV	Acantosis	Positiva	Negativa	11-16
32	CV	Acantosis	Positiva	Positiva	18
33	CIS	Acantosis	Positiva	Negativa	16-18

Ac Acantosis. Vg Vegetación. Vr Verrugosidad.

Es interesante destacar que se logró un mayor nivel de detección de DNA-HPV en las citologías que en las biopsias independientemente de la patología que se tratare. Es así que en las citologías se detectaron genomas de HPV en el 93% (13/14) de los carcinomas y en el 100% (4/4) de las leucoplasias y en el 100% (4/4) de los líquenes estudiados. Por el contrario, mediante la biopsia, sólo se logró la detección de DNA-HPV en el 50% (7/14) de los carcinomas, en el 50% (2/4) de los líquenes y en ningún caso (0/4) de las leucoplasias. **Fig 22.**

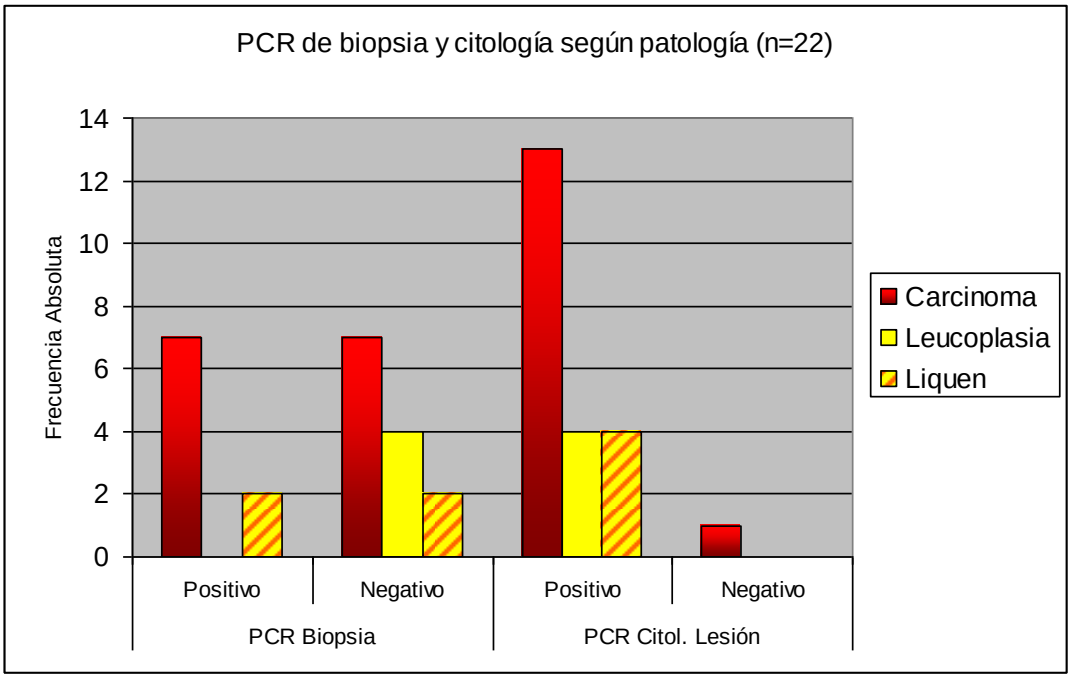
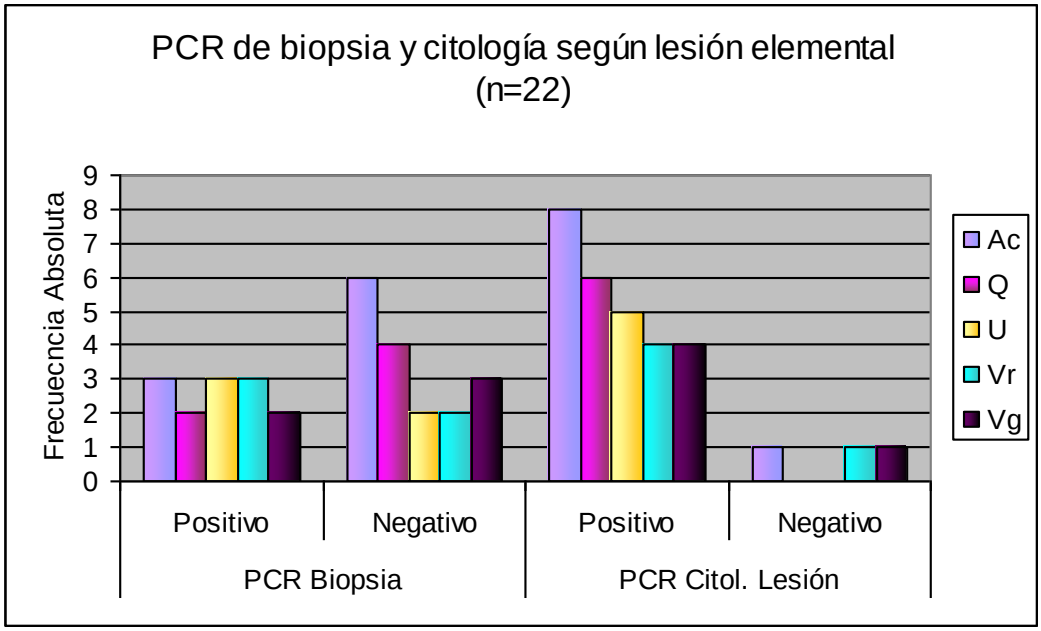


Fig. 22: Detección de HPV en leucoplasias, líquenes y carcinomas según el método de obtención de la muestra: biopsia y citología por raspado de la lesión.

Cuando se analizó el resultado de PCR en los tejidos y en las células de afecciones cancerizables y cánceres de acuerdo a las lesiones elementales diagnosticadas en el sitio preciso de toma del material, tomando como valor de referencia el resultado de PCR en la citología de la mucosa normal del contra-lado afectado, se pudo observar que la biopsia logró la detección de DNA-HPV sólo en 33% (3/9) de las acantosis, 33% (2/6) de las queratosis, 60% (3/5) de las úlceras, y en 60% (3/4) de las verrugosidades. Por el contrario con la citología se detectó el 100% de las queratosis y de las úceras y un 89% de las acantosis, y en un 80% de las vegetaciones y verrugosidades. **Fig. 23.**



Ac: acantosis. Q: queratosis. U: úlcera. Vr: verrugosidad. Vg: vegetación.

Fig. 23: Resultado de PCR en biopsias y citologías de lesiones cancerizables y cánceres de acuerdo a las lesiones elementales diagnosticadas en el sitio preciso de toma del material. El resultado de la sumatoria de las lesiones elementales es mayor a 22 debido a que algunos de los casos presentaban más de una de las lesiones elementales incluidas en el estudio.

3.2.2 Prevalencia de los distintos genotipos de HPV

Tomando en consideración que en el material recolectado por raspado se logró una mayor detección de genomas de HPVs que en el tejido obtenido por biopsias, la prevalencia de HPV 6, 11, 16 y 18 en lesiones orales pre-malignas y malignas en la población estudiada fue realizado subsecuentemente usando el raspado como único método de recolección de la muestra **Tabla 6.**

En la **Fig. 24** se muestra que de veinte y tres controles normales, 91.3% (21/23) fueron HPV negativos; mientras que de los dos controles que resultaron positivos a HPV, uno (4.3%) fue tipificado HPV 18 mientras que el otro (4.3%) presentó un genotipo de HPV indeterminado, es decir, otro distinto al 6, 11, 16 y 18) y por lo tanto no tipificado en este estudio. Ninguna de las lesiones cancerizables de los quince pacientes estudiados fue negativa, resultando 34% positivas para HPV 11, 34% para HPV 16, y 27 % para HPV 18. De los dieciocho pacientes con carcinomas ninguno de ellos resultó HPV negativo; por el contrario 5% presentaron HPV 6, 28% HPV 11, 67% HPV 16, y 34% HPV 18. Es de hacer notar que el 27% de los pacientes con lesiones pre-malignas mostraban co-infección con dos genomas de HPV (16/18 y 11/16); y el 28 % de los pacientes con lesiones malignas presentaron co-infección con dos

genomas de HPV (16/18, 11/16, y 11/18) y 11% con tres genomas de HPV (6/16/18).

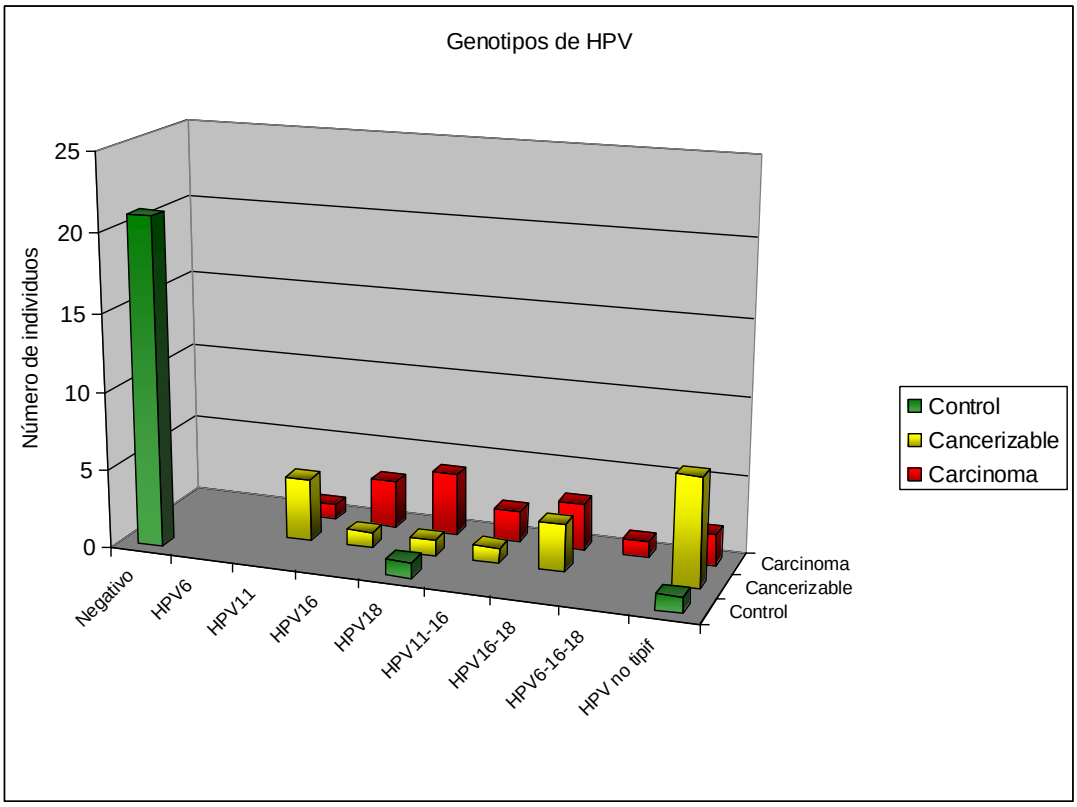


Fig. 24: Prevalencia de distintos genotipos de HPV así como de infecciones únicas o múltiples en controles normales, y en pacientes con lesiones potencialmente malignas y malignas.

En la **Fig 25.** se puede observar que de todos los genotipos de HPV tipificados en esta población el mayor porcentaje correspondió al 16 seguido por el 18 tanto en lesiones cancerizables como en cáncer; sin embargo sólo el HPV 18 fue detectado en los controles.

Por otra parte, al observar la distribución de los distintos genotipos de HPV estudiados según género y edad es de destacar que todos los controles masculinos fueron HPV negativos mientras que los que resultaron HPV positivos se observaron en mujeres. De los genotipos identificados en el sexo femenino se observó un genotipo indiferenciado en mujeres de edad menor a 40 años y un genotipo HPV 18 en mujeres de entre 40 y 60 años. **Fig. 26**.

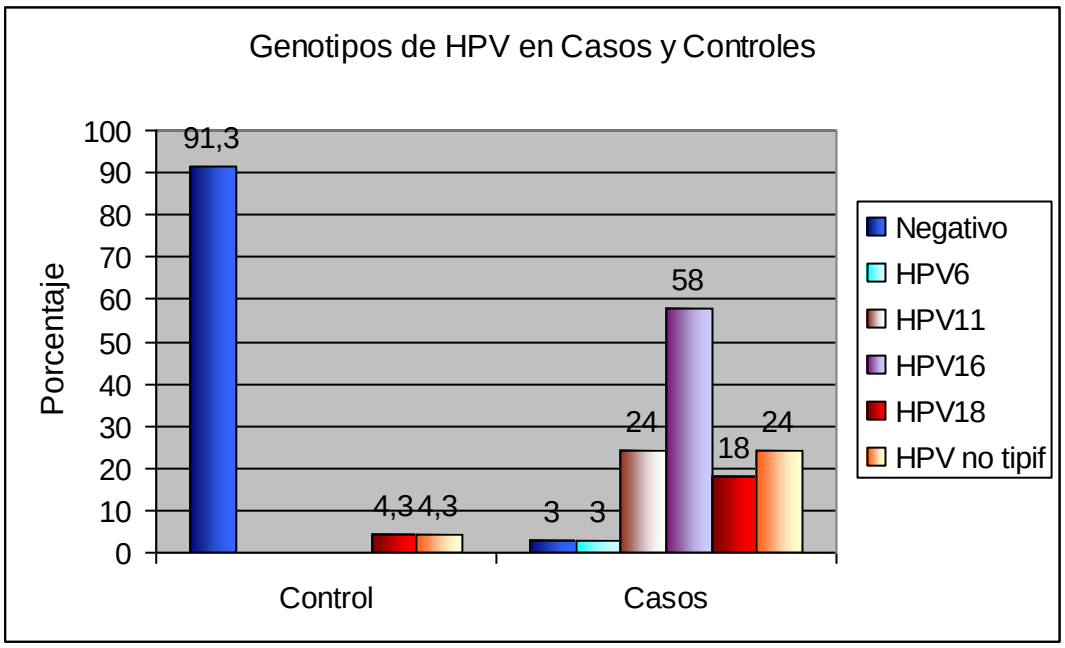


Fig. 25: Prevalencia de HPV 6, 11, 16 y 18, en controles, y en pacientes con lesiones potencialmente malignas y malignas.

Al analizar, según género y edad, los genotipos de HPV detectados, en los pacientes con lesiones cancerizables y cáncer, se observó un mayor porcentaje de varones menores de 40 años con lesiones cancerizables con genotipo HPV 16 (20%). En tanto, en relación al genotipo HPV 18 sólo se encontró en un 6,67% de pacientes varones con rango de edad 40 a 60 años. Contrariamente, el HPV 16 presentó el mayor porcentaje de detección (20%), en lesiones cancerizables, en mujeres mayores de 60 años mientras que el HPV 18 fue detectado tanto en mujeres de 40 a 60 años y en las mayores de 60. En los pacientes varones con carcinomas el mayor nivel de detección de genomas de HPV 16 se dio en los mayores de 60 años (16.67%) pero no se detectó HPV 18 a ninguna edad. Sin embargo se tipificó HPV 16 y HPV 18 tanto en las mujeres de 40 a 60 como en las mayores de 60. **Fig 27.**

Al considerar la sumatoria de ambos genotipos de HPV de alto riesgo, 16 y 18, es de hacer notar que en los pacientes de género masculino el mayor nivel de detección fue en los > 60 tanto en las lesiones cancerizables (67%) como en los carcinomas (33%). En las mujeres el hallazgo fue similar respecto a la edad no así a los valores que se mantuvieron en el 33% tanto para las lesiones pre-malignas como para las malignas. **Fig. 28.**

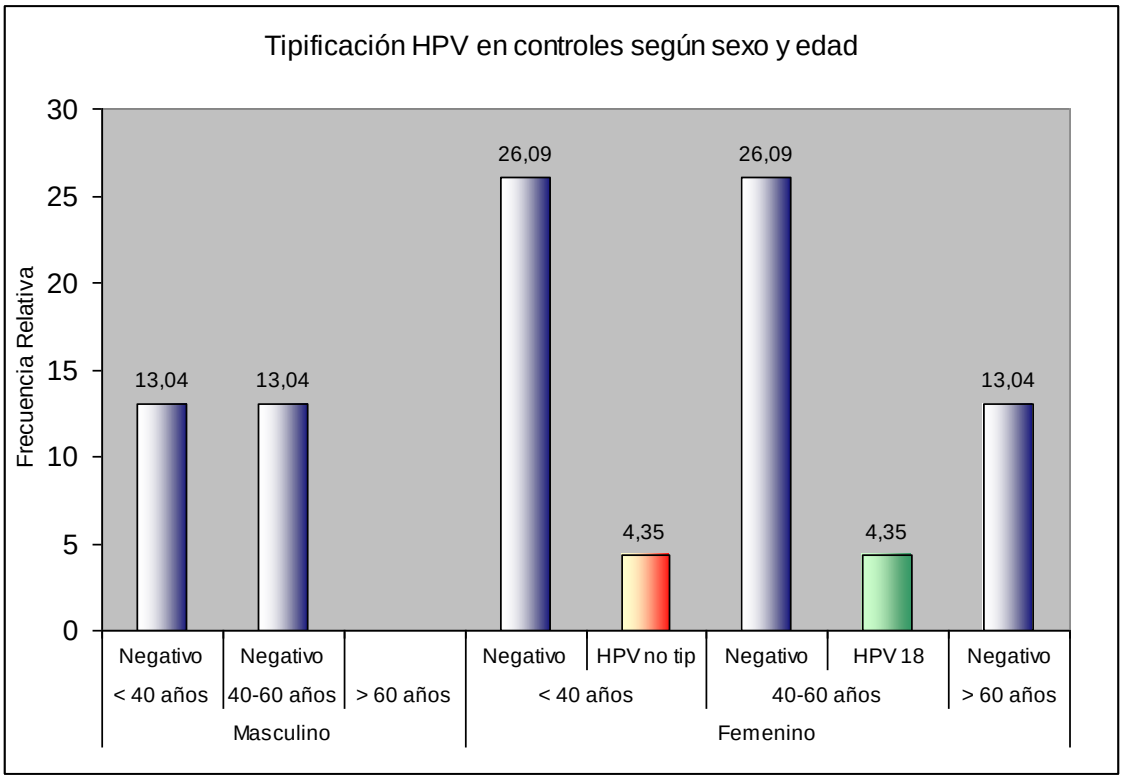


Fig. 26: Porcentaje de muestras positivas y negativas a la identificación de HPV en los controles según edad y género.

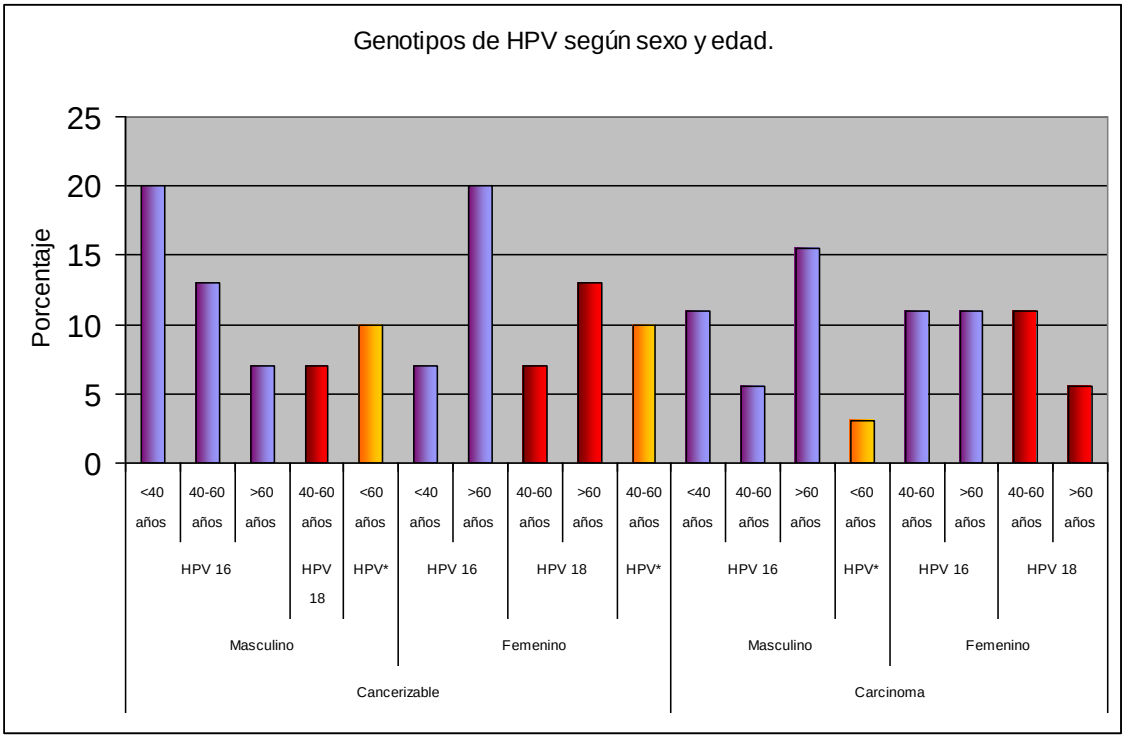
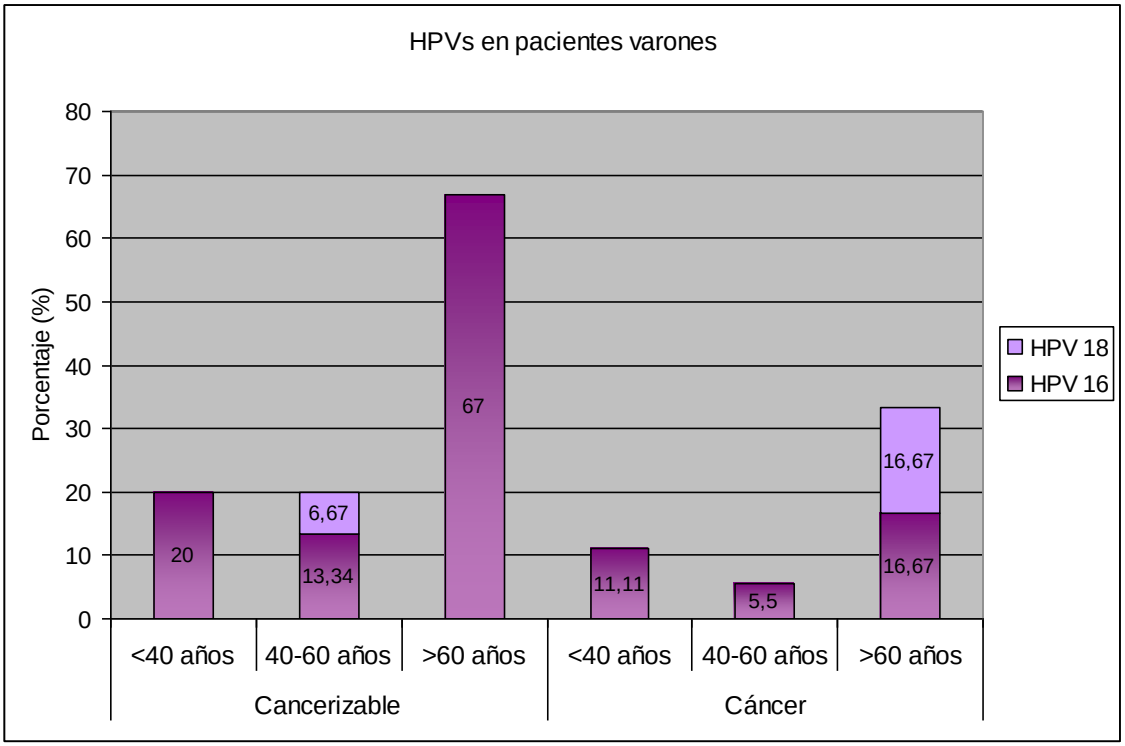


Fig. 27: Porcentaje de muestras positivas y negativas a la identificación de HPV en los casos según edad y género.

A



B

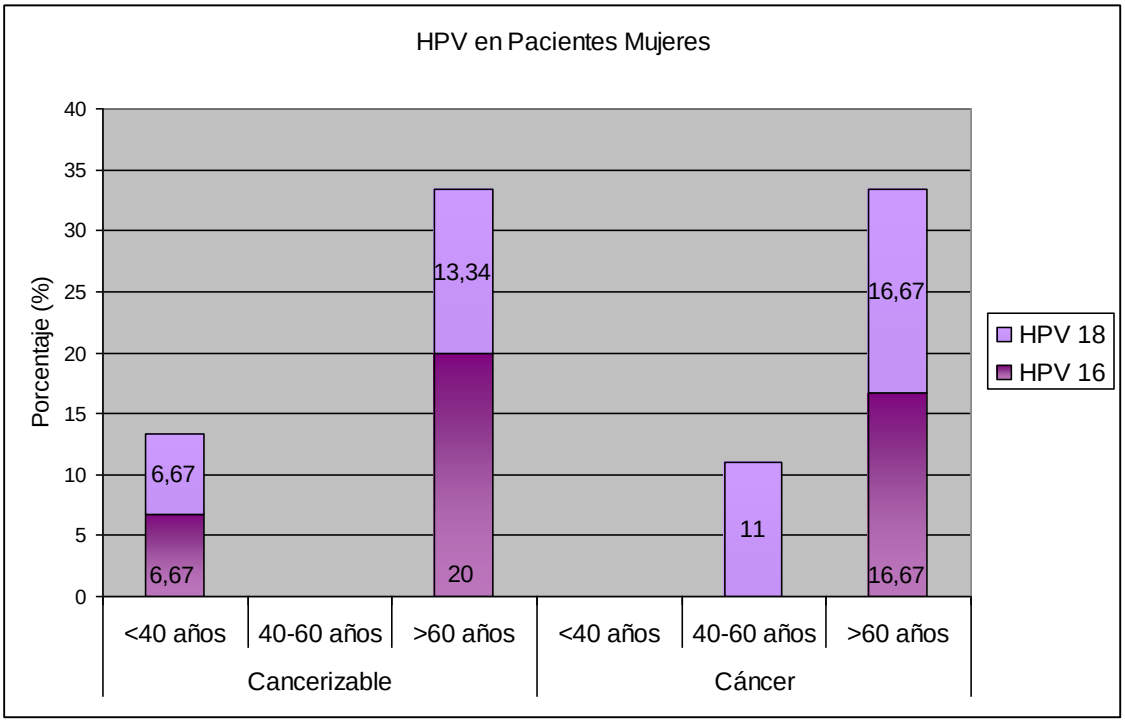


Fig. 28: Porcentaje de genotipos de HPV de alto riesgo (16, 18) en lesiones cancerizables y en cáncer según edad y género. **A:** Masculino, **B:** Femenino.

3.3 Correlación de la presunción clínica e histológica de infección con HPVs con los resultados obtenidos por PCR– Southern blot.

Del total de lesiones potencialmente malignas y malignas un 67% (22/33) se presumieron HPV positivas al examen clínico mientras que un 48 % (16/33) resultaron positivas para la coilocitosis en el examen histopatológico y el 100 % de las mismas poseían el genoma de HPV. **Tabla 6.**

La comparación de los resultados obtenidos por la técnica de PCR, con la presunción clínica y el examen histopatológico mostró cambios significativos en la respuesta entre estos métodos diagnósticos, demostrando una alta especificidad de la técnica de PCR en relación a las otras (prueba de McNemar, $p<0.05$). Este hecho también fue corroborado mediante el coeficiente de concordancia de Kendall´s W para muestras apareadas (CKW=0.22). Los valores del coeficiente varían entre 0 y 1; valores cercanos a 0 indican una baja concordancia entre los resultados de las técnicas. Es decir que, por ejemplo, en las muestras de biopsia y citología obtenidas de un mismo paciente no siempre se detecta la presencia de HPV en ambas muestras. **Tabla 8.** También es notable que la presunción clínica y la histológica detecten con un 100% de certeza a los verdaderos negativos (especificidad), no siendo así en relación a los verdaderos positivos (sensibilidad). **Tabla 9.**

TABLA 8: Comparación entre la presunción clínica de infección por HPV, presunción histopatológica, y la detección de genomas de HPV por la técnica de PCR – Southern blot.

Diagnóstico	HPV Presunción		HPV Coilocitosis		HPV genoma	
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
Controles (n = 23)	23	0	23	0	21	2
Lesiones Pre-malignas y Malignas (n = 33)	11	22	17	16	0	33

Tabla 9: Resultados de la prueba de Mc Nemar, sensibilidad y especificidad de la PCR en relación al examen clínico e histopatológico de las muestras estudiadas.

COMPARACIÓN ENTRE	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	PRUEBA DE MC NEMAR P- VALOR	COEFICIENTE KENDALL´S W *
Presunción clínica y PCR	0.63	1.0	<0.0001	0.22 (p=0.001)
Histopatología y PCR	0.51	1.0	<0.0001	
Presunción clínica-Histopatología			0.1797	

*por método de Monte Carlo basado en 10000 tablas muestrales comenzando en la semilla 2000000

La comparación de la precisión del diagnóstico - clínico, histopatológico y PCR en biopsias - realizado en 22 de los pacientes fue evaluada por el área bajo la curva ROC (ABC), que grafica la sensibilidad versus la especificidad. En este estudio se observó que el diagnóstico por presunción clínica fue el más preciso de todos los métodos (ABC=0.95), así es que en todos aquellos pacientes que tuvieron algunas de las lesiones elementales presumidas como HPV (+) (acantosis, vegetación, verrugosidad) asociadas a carcinomas o lesiones cancerizables se detectó por PCR genomas de HPV en el 95% de los casos. **Fig 29.**

Los valores del Área Bajo la Curva ROC para la totalidad de los pacientes estudiados (n=33) fueron del 0,70 para la presunción clínica y 0,76 para la presunción histológica.

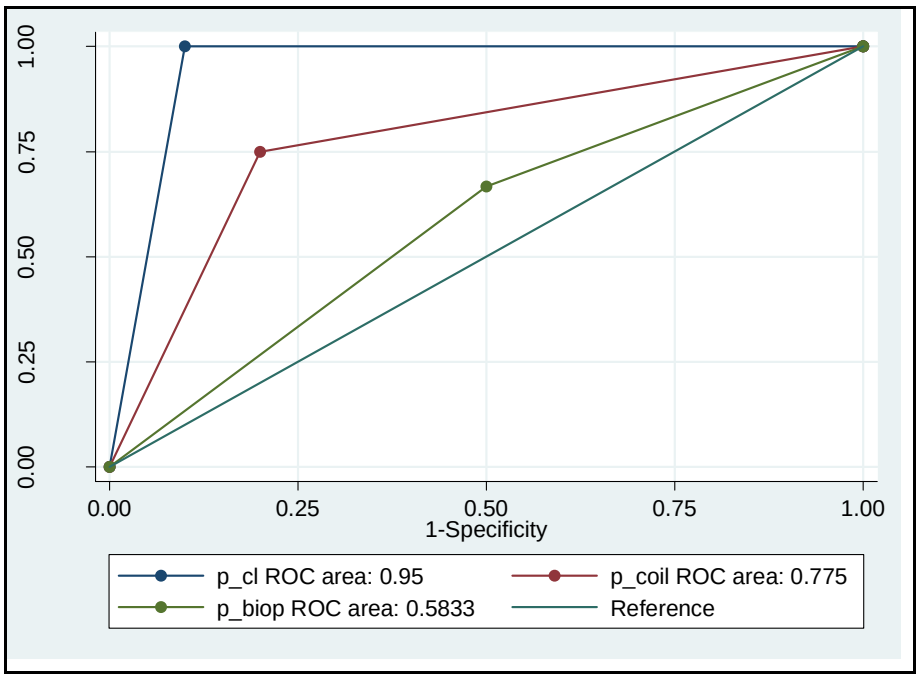


Fig. 29: Curvas ROC y su correspondiente área debajo de cada curva obtenidas con las probabilidades de un modelo logit para cada pacientes. *p_cl:* presunción clínica; *p_biop*: PCR en biopsia; *p_coil*: coilocitosis; *reference:* línea diagonal de referencia entre 0 y 1.

3.4 Correlación de la infección con HPV y otros factores co-carcinogénicos.

Los resultados de esta investigación muestran que un 40% y un 27% de los pacientes con lesión consumían tabaco o alcohol, respectivamente. Es importante destacar que 15 (100%) de los pacientes con lesiones precancerosas y 17 (94%) de los pacientes con carcinomas presentaron factores micro-traumatizantes crónicos comparados con 12 (52%) controles que también los presentaban. Además, 7 pacientes (47%) con lesiones potencialmente malignas y 16 (89%) con lesiones malignas estaban infectados con cándida mientras que sólo 2 (8%) de los controles presentaban candidasis. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 10**.

Tabla 10: Prevalencia de infección con HPV, tabaco, alcohol, factores microtraumatizantes y candidasis en controles, en lesiones cancerizables y en carcinomas.

DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO	IINFECCIÓN CON HPV (%)	TABACO (%)	ALCOHOL (%)	MICRO TRAUMA (%)	CANDIDASIS (%)
Controles Normales(n=23)	9	17	0	52	9
Lesiones premalignas (n=15)	100	40	27	100	47
Lesiones malignas (n=18)	100	56	39	94	89
Prueba Chi-Cuad p- Valor(*)	<0.0001	0.0374	0.0058	0.0003	<0.0001

(*) Para prueba de homogeneidad de proporciones.

Considerando conjuntamente las variables clínicas estudiadas se puede observar que un mayor porcentaje de pacientes con lesiones cancerizables y cáncer muestran presencia de HPV y factores micro-traumatizantes crónicos. **Fig. 30.**

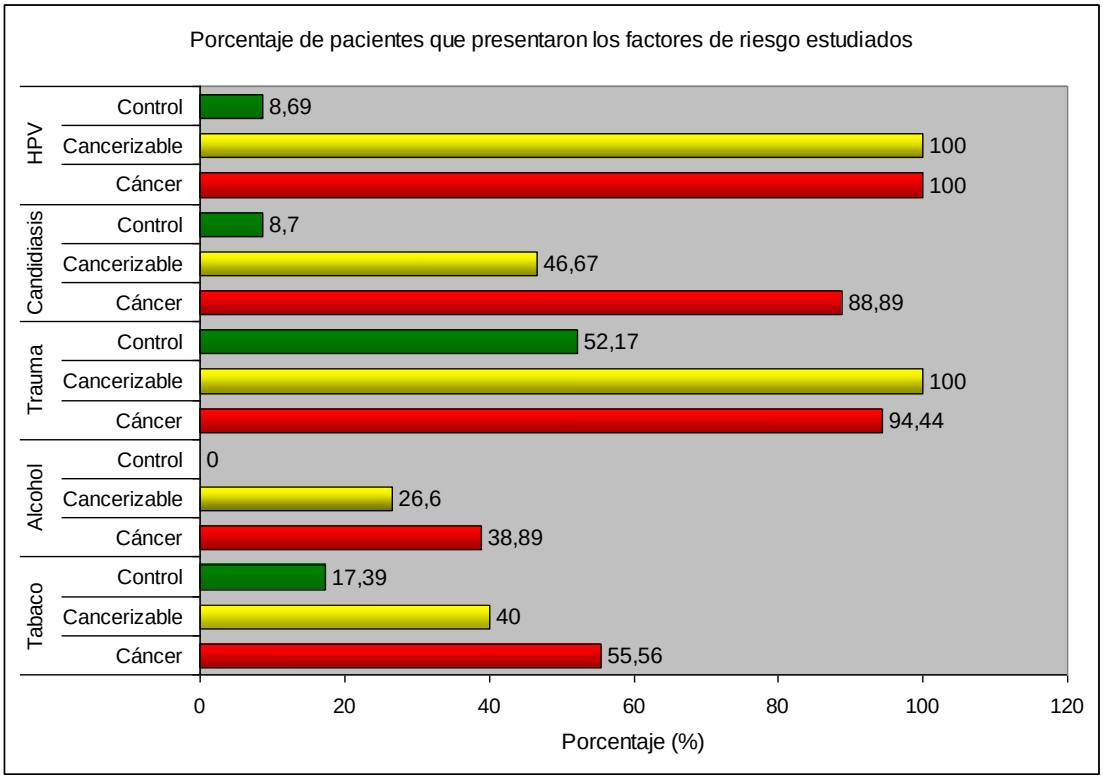


Fig. 30: Porcentaje de sujetos que por anamnesis o examen clínico presentaron los factores de riesgo estudiados.

Por otra parte se estudió la asociación entre factores considerados de riesgo carcinogénico como tabaco, alcohol, irritación mecánica crónica (trauma) y candidasis y la presencia de lesiones cancerizables y cánceres en la cavidad bucal mediante el método multivariado de Análisis de Correspondencia que representa las asociaciones en un espacio reducido con respecto al original. En la población bajo estudio se observó que los pacientes con diagnóstico de carcinomas y mayores de 60 años tenían asociados factores como candidiasis, infección con HPV y factores micro-traumatizantes crónicos, cuadrante inferior izquierdo, **Fig. 31**; mientras que los individuos con lesiones cancerizables en general presentaron una asociación con lesiones traumáticas y presencia de HPV, puntos cercanos representan variables asociadas, **Fig. 31.** Contrariamente la ausencia de candidasis, HPV y trauma está asociada a la los sujetos que presentaron su mucosa bucal clínicamente sana **Fig. 31**

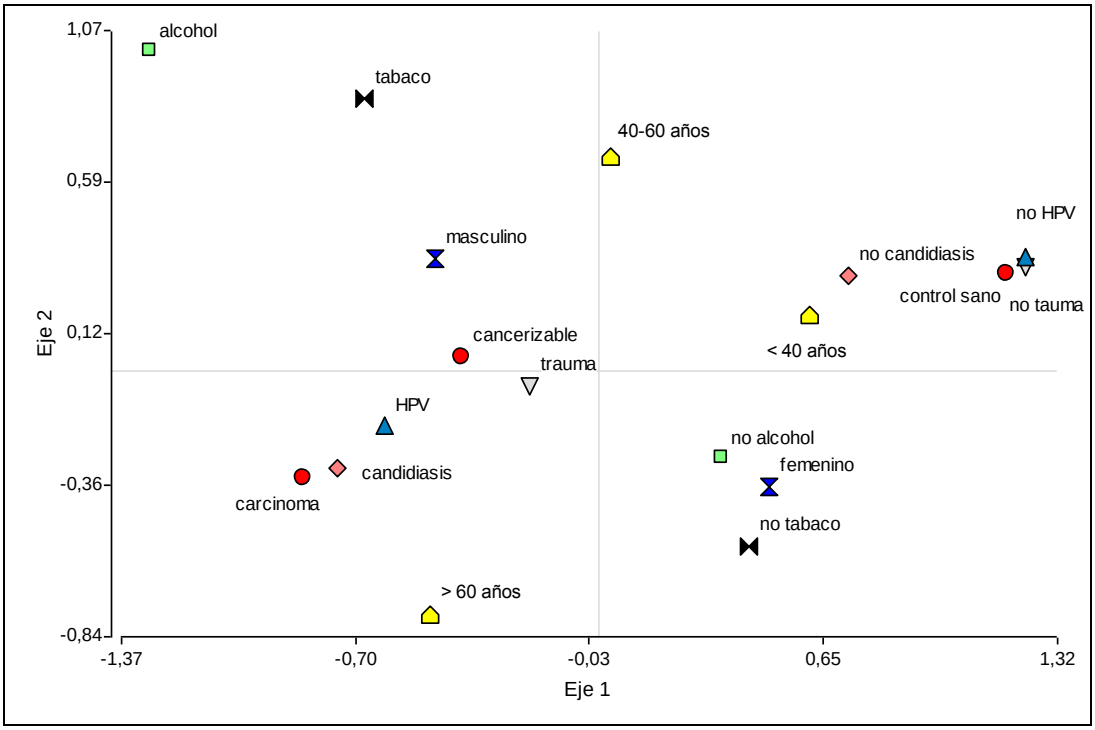
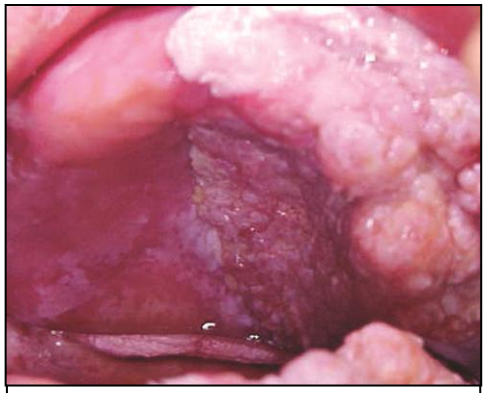


Fig. 31: Asociación entre los factores de riesgo y la presencia de lesiones cancerizables o cánceres en los pacientes estudiados. Los puntos cercanos en cada cuadrante representan asociación entre las variables más significativas. Análisis de Correspondencia, inercia acumulada para los dos primeros ejes del 63.73%.

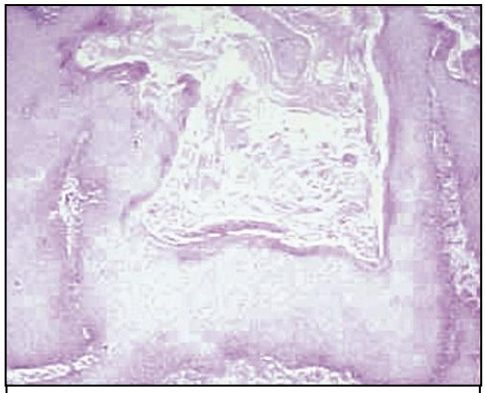
En las **Fig. 32, 33, 34, 35** se presentan los resultados de la detección de HPV según diagnóstico clínico, histológico y molecular, así como la presencia de los otros factores carcinogénicos registrados en 5 de los pacientes estudiados.

PACIENTE Nº 4

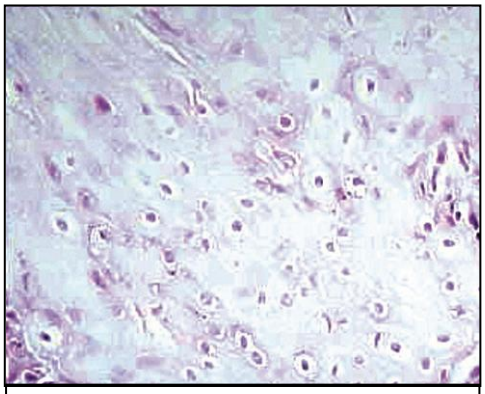


Lesión vegetante-verrugosa que involucra el reborde alveolar superior y el hemi-paladar izquierdo; en el derecho manchas rojas y blancas. acantoqueratóticas.

A mayor aumento polo anterior. Nótese las vegetaciones, verrugosidades, acantosis y en el angulo superior una úlcera de borde evertido.



Crecimiento epitelial frondoso con prolongaciones interpapilares voluminosas que penetran en el corion conservando la membrana basal. Hematoxilina-Eosina; 100 X.



En detalle sector con balonamiento de queratinocitos que muestran el aspecto característico de los coilocitos. Hematoxilina-Eosina; 400 x.

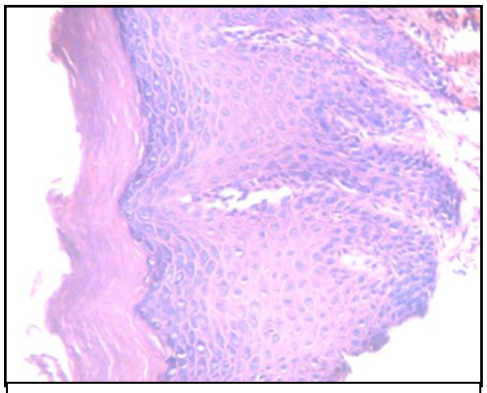
Diagn	P Clínica	P Histológ	PCR Biop	PCR Citol	Tabaco	Alcohol	Candida	Trauma
CV CEM	positivo	positivo	negativo	HPV 6-16-18	negativo	negativo	positivo	positivo

Fig. 32: Resultados de la detección de HPV según diagnóstico clínico, histológico y molecular. Asociación con otros factores carcinogénicos.

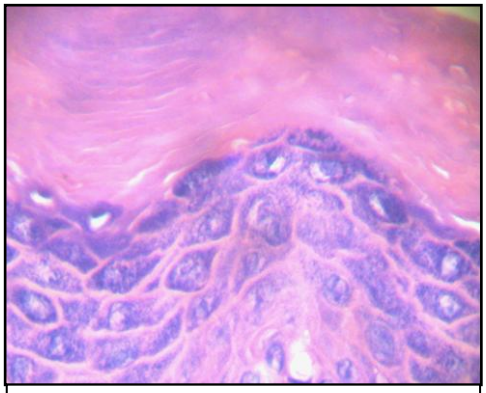
PACIENTE Nº 7

Lesiones queratóticas sobre encía y acantósicas en fondo de surco y hacia mucosa yugal.

A mayor aumento: queratosis con tendencia verrugosa sobre encía insertada. Acantosis en el polo anterior.



Mucosa Hiperortoqueratinizada con estrato granuloso marcado, acantosis del estrato de malphigi, moderada hiperplasia de la basal sin mostrar atipias celulares. 100x



Detalle del estrato granuloso donde se puede observar en algunas células una vacuolización citoplasmática que se puede interpretar como degeneración coilocítica. 400x

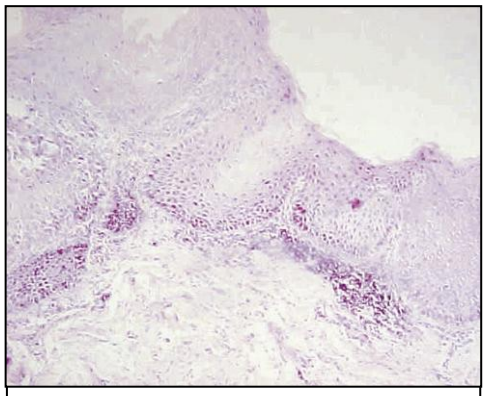
Diagn	P Clínica	P Histológ	PCR Biop	PCR Citol	Tabaco	Alcohol	Candida	Trauma
Leucoplasia	Negativo	Positivo	Negativo	HPV 16-18	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo

Fig. 33: Resultados de la detección de HPV según diagnóstico clínico, histológico y molecular. Asociación con otros factores carcinogénicos.

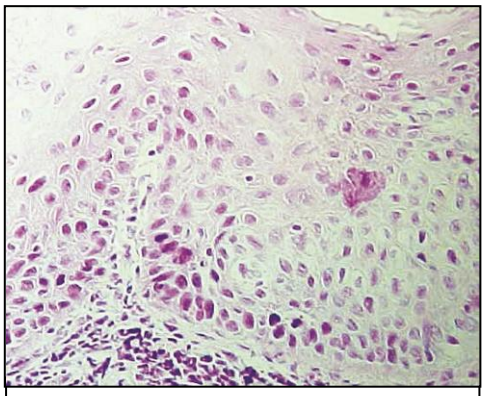
PACIENTE Nº 9

Lesiones queratóticas y acantóticas dispuestas en parches sobre fondo eritematoso atrófico.

Lesiones acantósicas sobre profusa red vascular en pilares y paladar blando izquierdo.



Epitelio plano estratificado con áreas de atipia de diversa intensidad, de moderada a severa, alcanzando en focos aspecto de carcinoma *in situ*. Hematoxilina-Eosina: 100 x.



A mayor aumento se destacan sectores con coilocitosis intensa en estratos medio y superior. Hematoxilina-Eosina; 400 x.

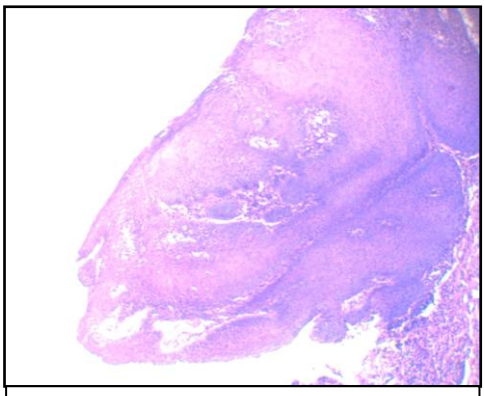
Diag.	Presunción Clínica	Presunción Histológ	PCR Biop.	PCR Citol.	Tabaco	Alcohol	Cándida	Trauma
CIS	Positivo	Positivo	Negativo	HPV 11-16	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo

Fig. 34: Resultados de la detección de HPV según diagnóstico clínico, histológico y molecular. Asociación con otros factores carcinogénicos.

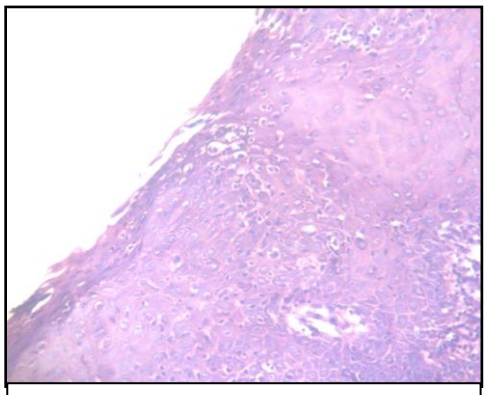
PACIENTE Nº 32

Lesiones acantóticas puntiformes sobre fondo eritematoso atrófico. Zona de toma biópsica. Nótese mancha blanca tenue en la periferia.

Líquen maculoso y atrófico en tercios externos de dorso lingual de la misma paciente



Crecimiento epitelial frondoso con conservación de la membrana basal; papilas coriónicas delgadas y alargadas. Hematoxilina- Eosina; 60x.



A mayor aumento detalle del epitelio para-cornificado donde pueden observarse células con degeneración coilocítica. Hematoxilina- Eosina; 200x.

Diagn	P Clínica	P Histológ	PCR Biopsia	PCR Cito	Tabaco	Alcohol	Candida	Trauma
C V	Positivo	Positivo	*	HPV 18	Positivo	negativo	Positivo	Positivo

Fig. 35: Resultados de la detección de HPV según diagnóstico clínico, histológico y molecular. Asociación con otros factores carcinogénicos.
* PCR en biopsia no realizada.

Capítulo IV

Discusión

Si bien en los últimos 25 años se incrementó el interés por el estudio del virus del papiloma humano debido a su potencial participación en la patogénesis de los tumores malignos; es desde hace tiempo que se conoce que lesiones bucales benignas como el papiloma escamoso, el condiloma acuminado, las verrugas y la hiperplasia epitelial focal se encuentran asociadas a la infección con HPV (212-218). También se ha detectado DNA-HPV en individuos que presentaban al examen clínico una mucosa normal (219-226) y en pacientes con lesiones bucales tales como leucoplasias, líquenes, y carcinomas verrugosos y espinocelulares (225-230). Por otra parte, en lesiones malignas de cuello de útero, se han identificado y reconocido como responsables de éstas, a genotipos de HPV de alto riesgo (231).

A causa de la variabilidad de los métodos de detección del DNA-HPV es que la implicancia del HPV en la carcinogénesis oral ha generado resultados controvertidos, presentando un rango de detección desde el 0% hasta el 90% en lesiones potencialmente malignas y malignas. Numerosos trabajos destacan que la detección del DNA-HPV varía ampliamente, aún en la misma lesión. Este hecho se debería a:

- las técnicas empleadas tienen diferente sensibilidad (baja, mediana o alta);
- los distintos métodos de preservación de las muestras biológicas como son los cortes de tejidos incluidos en parafina o los tejidos/células frescos mantenidas a temperaturas de -20º C o inferiores (155,229,232).

Varios son los trabajos que se han referido a la identificación del HPV empleando técnicas de diferente sensibilidad, ya sea la inmunohistoquímica (152), la hibridación *in situ* (233,234) y las diferentes variantes de la reacción en cadena de la polimerasa (235,236), seguido a veces por el Southern (237,238) o el dot blotting (239,240). Incluso varios grupos de investigación han empleado una combinación de dos o más de los análisis ya mencionados a los fines de lograr niveles mayores de detección (241). Sin embargo, pocos estudios se han referido a los métodos de obtención del material a pesar de que la técnica de recolección de la muestra requiere de la mayor atención debido a que juega un importante rol en la acertada detección del HPV.

En nuestro país el diagnóstico confirmatorio de presencia de HPV en la mucosa bucal se realiza básicamente por biopsia mediante técnicas

convencionales histológicas en base al hallazgo de coilocitos y, en la actualidad, también por medio de tecnologías moleculares como la PCR.

La biopsia, si bien en la mayoría de los casos es de fácil ejecución, es a menudo rechazada por los pacientes, especialmente en aquellas situaciones clínicas referidas al seguimiento o ante la presencia de una mucosa de apariencia sana. Como es sabido, para la identificación del DNA-HPV por PCR, se necesita aislar el DNA de las células afectadas requiriéndose sólo pequeñas cantidades del mismo. Como ya ha sido ampliamente probado, el DNA puede ser obtenido a partir de los tejidos biopsiados (242-248). No obstante, la obtención del DNA mediante la recolección de las células de la mucosa bucal aplicando una técnica no invasiva, incruenta y fácilmente aceptada por los pacientes resulta de gran importancia para el diagnóstico precoz, la prevención y la terapéutica de aquellas personas pertenecientes a grupos de riesgo.

En relación a la sensibilidad en la detección de DNA-HPV en los diferentes tipos de muestras (tejidos obtenidos por biopsia o células recolectadas por citología), nuestros resultados prueban que técnicas sencillas como la citología por raspado puede ser utilizada con un alto grado de confiabilidad en la detección de infecciones por HPV. Nuestra investigación demuestra que es más probable detectar DNA-HPV en aquellas muestras obtenidas por citologías exfoliativas a través del raspado que en las obtenidas por biopsias ($p<0.05$) **Tabla 6, fig. 21.** La posibilidad de que la menor detección de genomas de HPV en las biopsias se debiera a una insuficiente cantidad de DNA fue desestimada ya que todas las muestras se sometieron a la cuantificación del mismo por medio del análisis de slot-blot. Aún más, teniendo en cuenta que las biopsias presentan mayor número de células y por ende una mayor cantidad de DNA, se podría pensar que los resultados obtenidos podrían deberse a un efecto técnico inhibitorio de la PCR en los tejidos obtenidos por biopsias. Sin embargo este efecto fue descartado ya que se chequeó la calidad del DNA por medio de la amplificación estándar del gen de la β-globina humana. Por lo tanto, el hallazgo de una mayor detección de DNA-HPV en las muestras biológicas obtenidas por raspado se podría explicar por los mecanismos biológicos de infección que presenta el HPV. Es conocido que en una etapa latente o lisogénica el DNA-HPV se incorpora al genoma eucariota o se mantiene extra-cromosómico y se duplica conjuntamente con las células generando una infección de los estratos

epiteliales superiores al basal y, en condiciones óptimas, en otra etapa de su ciclo de vida, cuando alcanza los estratos epiteliales superficiales, el virus comienza su fase lítica y la consiguiente aparición de los fenotipos celulares característicos de esta infección (249). Al respecto, investigadores como Syrjanen y col. (250), en un estudio de 102 pacientes con diagnóstico confirmado de HPV en cuello de útero, reportaron un aumento progresivo en el porcentaje de detección de HPV en los estratos epiteliales, siendo menor el porcentaje de detección en las células del estrato basal (5.8%) y mayor en las células del estrato superficial (100%). De acuerdo a estos hallazgos nuestros resultados son esperables ya que es en los estratos más superficiales del epitelio donde se encuentra una mayor cantidad de DNA viral. Probablemente este hecho se debe a que el raspado recolecta el DNA de los sectores superficiales del epitelio mientras que la biopsia lo obtiene de todos los estratos pero en una superficie más reducida. Además, si bien el valor medio del DNA encontrado en las biopsias fue de 4 a 2000 veces más alto que el valor medio del DNA de las citologías, es de suponer, por lo anteriormente expresado, que en los primeros especimenes era mayor la cantidad de DNA celular que viral.

La obtención de células de la mucosa también puede realizarse por medio de enjuagues o cepillados (251). Estos diferentes modos de recolección han demostrado ser eficaces en permitir la detección de DNA-HPV por medio de la PCR. Tanto los enjuagues con soluciones salinas o los realizados con sucrosa han resultado exitosos en la detección de este virus (219). Asimismo, el cepillado de la mucosa se ha empleado con muy buenos resultados según lo publicado en numerosos estudios (252-254). Sin embargo, otros investigadores sostienen que las muestras obtenidas por éste método no fueron representativas de la lesión en términos de frecuencia y tipos de HPV detectados (231,255).

Coincidente con nuestros resultados, Lawton y col. (219) lograron un mayor porcentaje de detección de DNA-HPV por PCR en las células obtenidas por raspado de tres sitios diferentes (45%) y en las recolectadas por enjuagues (51%) que en las biopsias de mucosas normales de los mismos pacientes (12%). Por otra parte, Brandsma y colaboradores (256), ya en 1989, comentaban que las infecciones subclínicas son difíciles de detectar por medio de la biopsia debido a lo limitado del área a analizar.

Cuando se cepilla una zona lesionada de la mucosa bucal factores tales como: la ubicación de la lesión, el dolor y la visibilidad pueden limitar la recolección de células de ese sector y así afectar el grado de detección de HPV. Basándose en esta realidad Giovannelli y col. (257) consideraron de interés evaluar si cualquier variación en la recolección de la muestra podría optimizar la detección de HPV en términos de frecuencia y/o tipificación. Con tal propósito investigaron si la presencia del DNA-HPV en la lesión se correlacionaba con la presencia de DNA-HPV en las células de un sitio normal adyacente a la lesión basándose en la hipótesis de que las células infectadas que contiene HPV pueden proliferar y permitir la diseminación viral a sitios adyacentes. Además, al ser estás áreas indoloras, facilitaban la recolección. Si bien no encontraron diferencias significativas entre la detección de HPV en la lesión y la mucosa adyacente, observaron que la prevalencia del HPV era menor en los sitios queratinizados comparado con los no queratinizados por lo cual concluyen que resulta más dificultoso de encontrar HPV en las lesiones localizadas en epitelios queratinizados que en los no queratinizados. Teniendo en cuenta que hay una gran variabilidad en el grado y el tipo de queratinización en los distintos sectores de la cavidad bucal (258) y que en la mucosa clínicamente normal es más difícil obtener muestras citológicas de los sitios queratinizados de los no queratinizados (259), la exactitud de los resultados de citologías obtenidas de lesiones queratinizadas se planteó como un motivo de preocupación. Sin embargo, en este estudio nosotros logramos detectar DNA-HPV en el 100% (8/8) de las lesiones cancerizables que presentaban cornificación (leucoplasias y líquenes) mientras que en las biopsias de las mismas se detectó sólo en el 25% (2/8). **fig. 23**. Este hecho es esperable ya que por medio del raspado se obtienen no sólo las células de las capas más superficiales (cornificadas) sino también de las intermedias y de una superficie mayor de la lesión involucrada.

Aunque varios estudios han centrado su atención en la presencia de HPV en los tejidos normales adyacentes a lesiones carcinomatosas (260-263) y en mucosas adyacentes a lesiones de leucoplasias y líquenes bucales (258); sólo J. D' Costa y colaboradores (209), en 1998, compararon los resultados de biopsias de afecciones cancerizables con los de la mucosa bucal correspondiente encontrando DNA-HPV 16 en 27/80 (34%) de las lesiones

premalignas (leucoplasias, líquenes, fibrosis submucosa, ertitroplasia, melanoplaquia) y en 15/48 (31%) de las mucosas de apariencia normal. Los resultados obtenidos les permitieron suponer que toda la mucosa oral, inclusive la de apariencia clínica normal, puede presentar partículas virales, probablemente en una fase latente.

Los resultados de nuestra investigación demuestran que el DNA-HPV fue detectado tanto en los raspados obtenidos de las lesiones como en los de la mucosa normal homónima contra-lateral, **Tabla 7, fig. 21,** hecho que confirmaría la presunción realizada por D' Costa (209) referente a la factibilidad de que toda la mucosa bucal presente partículas virales. Contrariamente Ostwall C y col. (260) sostienen, en función de los resultados de su trabajo, que la detección de DNA-HPV decrece significativamente en la mucosa sana a medida que se aumenta la distancia al tumor (26.9-3.8%) sugiriendo infecciones por HPV localizadas. Sin embargo estudios más recientes sobre infecciones múltiples (263) demuestran la presencia de DNA-HPV tanto en el tumor como en el tejido adyacente.

La primera presunción de presencia de HPV es la que realiza el clínico estomatólogo a través de la identificación de ciertas lesiones elementales, vegetaciones y verrugosidades, vinculadas desde hace tiempo a este tipo de infección (168,177). Sin embargo, es necesaria la confirmación del diagnóstico clínico mediante el análisis anatomopatológico. Este fue durante muchos años y aún sigue siendo hoy en día de gran importancia, pero el desarrollo de las técnicas basadas en los conocimientos de la biología molecular han permitido incorporar metodologías mucho más específicas, sensibles y objetivas para la confirmación de estas infecciones (190-192).

En relación a los diferentes tipos de lesiones observables al examen estomatológico, autores como Fornatora M. (180) en un estudio publicado en 1996 comunican la existencia de un subtipo de displasia epitelial oral con características clínicas e histológicas únicas y que probablemente tendrían valor predictivo de presencia de HPV. Estos investigadores describen clínicamente a este tipo específico de "displasia coilocítica" como lesiones blancas, planas o ligeramente elevadas con aspecto de un guijarro (poroso, semejante a la piedra pómez) o papilar. A nivel histológico, estas lesiones presentaron características semejantes a las de las displasias, es decir

proliferación y maduración de las células basales, pleomorfismo nuclear y nucleolar, aumento en el número de las mitosis, prominencia nucleolar, aumento de la relación núcleo/citoplasma y figuras mitóticas atípicas. Considerando además que aquellas muestras biológicas que presentaron acantosis, coilocitosis y queratinocitos bi o multinucleados posiblemente estaban infectadas con HPV.

Basados en estas descripciones y en otras realizadas en cuello de útero (264-269) y teniendo en cuenta, la identificación de semejanzas morfológicas entre la mucosa bucal y la de cuello de útero, decidimos comprobar que grado de veracidad tenia la presunción de que las afecciones de la mucosa oral que presenten lesiones blancas ligeramente elevadas de aspecto húmedo, translúcido, leuco-edematoso que hemos denominado acantosis (a veces alternando con áreas eritematosas) así como las de aspecto vegetante-verrugoso, especialmente si son persistentes en el tiempo, multifocales, y recurrentes, puedan ser manifestaciones clínicas de infección con HPV.

La presunción clínica, tal como lo demuestran los resultados de nuestro estudio, **Fig. 29**, **Tablas 8 y 9**, tuvo un acierto del 95% en detectar los verdaderos negativos (especificidad) no así en lo referente a la sensibilidad (capacidad de detectar a los verdaderos positivos). Esta discrepancia se debería al hecho de que las técnicas de biología molecular pueden detectar infecciones latentes sin producción viral. A pesar de esta diferencia esperable de sensibilidad, la notable precisión diagnóstica avala que estas características clínicas podrían ser utilizadas para determinar un esquema de seguimiento más estricto de aquellos pacientes con lesiones orales malignas y potencialmente malignas o de las poblaciones expuestas a factores de riesgo.

Por otra parte, la presunción de clínica de infección por HPV en lesiones orales potencialmente malignas y malignas estuvo altamente correlacionada con el diagnóstico histopatológico de infección con HPV (coilocitosis). Este hecho puede deberse a que los cambios morfológicos generados por el virus a nivel tisular ocasionen manifestaciones macroscópicas que podrían ser interpretadas adecuadamente por un profesional capacitado.

Si bien en un estudio realizado por Bouda y col. (270) se logró detectar, con el uso de una PCR altamente sensible, la presencia de DNA-HPV en el 91% de lesiones bucales (leucoplasias con las características histológicas de la

hiperplasia y/o de la displasia y carcinomas espinocelulares), lo que representaba un porcentaje de infección cercano al encontrado por nosotros, no se realizó la correlación entre los resultados de la detección de DNA-HPV por el análisis de PCR-Southern blot, la presunción clínica y el diagnóstico histopatológico. Ésta correlación sólo ha sido divulgada en la literatura en estudios de infecciones por HPV en el tracto genital (271), no hemos encontrado ninguna publicación que haga referencia a esta correlación en lesiones de la mucosa bucal.

Aún hoy en día no existe un acuerdo sobre la presencia del HPV, como un factor de riesgo, en las lesiones precancerosas y cancerosas bucales (272). Aunque algunos grupos de investigadores identificaron antígenos de HPV y DNA viral en lesiones orales malignas y potencialmente malignas (234,273-274), otros sostienen que sólo está presente transitoriamente y no como un factor co-carcinogénico. Así algunos autores sugieren que los hallazgos ocasionales del DNA de HPV en especimenes del tejido de carcinomas espinocelulares puedan ser el resultado de una colonización fortuita del HPV de la mucosa oral, más bien que de la infección viral, y que los HPVs juegan un papel limitado en la etiopatogénesis de estos carcinomas de la mucosa bucal (272).

No obstante, un estudio de meta-análisis realizado desde 1982 a 1997 (226) demostró que existe una posibilidad 2 a 3 veces mayor de presentar infección por HPV en lesiones precancerosas que en la mucosa clínicamente normal y de 4,7 veces más en los carcinomas espinocelulares orales.

Los resultados del presente estudio, **Tabla 7,** demuestran que el 100% de los pacientes con lesiones precancerosas o cánceres de la mucosa bucal eran HPV positivos en las muestras obtenidas por raspado superando ampliamente a los porcentajes publicados en la literatura.

Sin embargo, es de destacar, que hay una gran variabilidad en la detección del DNA-HPV en las diferentes poblaciones estudiadas, pudiendo este hecho deberse a diferencias socio-culturales, a una distinta capacidad inmunológica y/o a la desigual exposición a factores de riesgo ambientales de los individuos.

Evaluando los diferentes genomas virales detectados en esta investigación (6,11,16,18) observamos que el 34% de los pacientes con lesiones cancerizables tenían HPV 16, y el 27 % de ellos poseían HPV 18, **Fig. 25**. En los

carcinomas el 67 % de los pacientes tenían HPV 16, y el 34% HPV 18, **Fig. 25**. Es de hacer notar que el 27% de los pacientes con lesiones cancerizables y el 39% con carcinomas estaban infectados con más de un de genotipo de HPV, **Fig. 24**. Estos resultados difieren de los publicados por Sugiyama y col. (225) en el año 2003. Estos autores, en una investigación realizada en biopsias obtenidas de mucosas normales, lesiones cancerizables y carcinomas espinocelulares bucales, observaron infección por HPV 16 en el 61% de las displasias epiteliales, en el 36% de las mucosas normales y en el 35% de los carcinomas, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre las primeras y los últimos. Justifican este hallazgo sugiriendo que el HPV 16 podría relacionarse a una etapa temprana de la carcinogénesis, especulando que actuaría como un iniciador de la proliferación pero no sería un requisito para el mantenimiento y la progresión a la malignidad. También, autores como D' Costa y col. (209) reportaron DNA-HPV sólo en el 15% de los carcinomas mientras que en las lesiones cancerizables fue detectado en el 34% de los casos.

Anteriormente, Cruz y colaboradores (241), habían sugerido la posibilidad de que ocurriera una disrupción y una pérdida de las regiones tempranas y tardías debido a la integración del HPV al genoma del huésped, resultando en la inhabilidad de detectar HPV por PCR usando los primers L1.

Sin embargo, en los cacinomas bucales, se ha reportado que el HPV existe predominantemente en forma episomal y raramente integrado, en consecuencia debería ser detectado sin inconvenientes con los primers L1 (275,276).

Nosotros pensamos que tales hallazgos se deberían a un déficit de detección ya que se utilizaron muestras de sectores reducidos (biopsias) y posiblemente altamente indiferenciados, siendo ya ampliamente conocido que el HPV necesita de células diferenciadas para su replicación, de modo tal que si bien la cantidad de DNA encontrado sea alta la de DNA viral sea proporcionalmente baja disminuyendo así la sensibilidad de la PCR.

Por su parte, Giovanelli y col (252) determinaron la presencia de DNA-HPV en las células exfoliadas de 121 pacientes con diferentes tipos de lesiones de la mucosa oral (13 carcinomas espinocelulares, 59 lesiones potencialmente malignas, 49 ulceraciones benignas) y de 90 controles. El DNA-HPV fue

detectado por la PCR anidada (nested) y el genotipo determinado por la secuencia del DNA. Estos autores encontraron, una prevalencia de HPV del 61,5% en los carcinomas, 27,1% en las lesiones potencialmente malignas, 26,5% en las ulceraciones y 5.5% en los sujetos controles, siendo las diferencias significativas entre las lesiones premalignas y malignas y los controles no así con las ulceraciones. Además, observaron que el riesgo de asociación de infección con HPV y carcinomas y lesiones cancerizables fue claramente mayor (OR, 14.4; 95% CI, 1.37 21.98 y OR, 7.8; 95% CI, 1.69 36.1, respectivamente). Estos resultados coinciden con los nuestros ya que también encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de detección en mucosa normal y las lesiones pre-cancerosas y cancerosas.

Más recientemente, este grupo italiano de investigación observó que en las leucoplasias se detectó HPV en el 22% de las muestras de la lesión y en un 16% en los sitios adyacentes, en los líquenes en el 24,5% y en 22.4% de las lesiones y sitios adyacente respectivamente, y en el 35.3% y el 41.2% en las mucosas de pacientes con carcinomas espinocelulares (257).

Por el contrario, nosotros tuvimos un promedio de detección del 95-100% tanto en lesiones pre-malignas como malignas no habiendo diferencias significativas entre la citología de la lesión y la mucosa normal contra-lateral. Niveles tan altos de detección no se debieron a contaminación ya que se tomaron especiales recaudos tanto durante la obtención del material (277) como su manipulación en el laboratorio: ambientes distintos, equipos y materiales diferentes para la preparación de las muestras y para la electroforesis. Limpieza de las pipetas con hipoclorito, y mantenimiento de la mayoría de los materiales bajo la luz ultravioleta (278).

La alta prevalencia de infección con HPV 16 que encontramos coincide con los resultados publicados para las infecciones de cuello de útero para las mujeres de Latino América y de Europa en general y de Argentina en particular (284).

En otros trabajos publicados respecto a la prevalencia de los distintos genotipos de HPV en cavidad bucal se encontró HPV 18 en el 86,5% de las lesiones malignas y pre-malignas y en el 80% de los controles normales positivos (252), o del 66% de HPV 18 versus 11% de HPV 16 de todas las muestras que resultaron positivas (257). Estos hallazgos tan disímiles

indicarían una prevalencia diferente de los genotipos de HPV, probablemente asociado al origen geográfico de las muestras, habiéndose descrito, por ejemplo, una evidente diferencia de los genotipos de la población de Sicilia y la población del resto de Italia (285). También el HPV 18 fue el genotipo más frecuentemente encontrado en la población griega (286) que es genéticamente similar a la del centro y sur de Italia (287).

En relación a la presencia de más de un genotipo de HPV, nosotros observamos que las técnicas empleadas permitieron detectarlos sin inconvenientes, coincidiendo con estudios realizados en cuello de útero, en donde encuentran diferencias en los resultados de acuerdo al método utilizado para la recolección de la muestra demostrando que se detecta más frecuentemente la infección con múltiples genotipos de HPV en las citologías que en las biopsias (288).

Numerosos autores observaron la más alta prevalencia de los HPVs oncogénicos en los pacientes mayores de 50 años (279-281) y nuestros hallazgos coinciden con estas observaciones. **Fig. 27, 28.**

Estos hallazgos implicarían que después de la infección inicial con HPV se requiere de un tiempo prolongado antes de que ocurra la transformación maligna de las células epiteliales (282). Coincidentemente, en estudios de cuello de útero en los cuales no se ha alterado la historia natural de la neoplasia intraepitelial cervical (CIN: displasia leve, moderada, severa y el carcinoma in situ) se ha revelado, por biopsia cervical, una tasa progresión de leve a severa en menos de un tercio de los casos. Sin embargo, cuando está infectado por HPV, la progresión a CIN severa es 2 o 3 veces más alta. A pesar de esto, la mayoría de las anormalidades del cuello de útero no se transformarán en cáncer invasor, aunque sean libradas a su evolución. La variación entre el alto índice de la infección con HPV, el índice intermedio de neoplasia intraepitelial cervical y el índice relativamente bajo de cáncer de cuello de útero establece que a medida que aumenta la severidad de la enfermedad disminuye su predominio. En un huésped inmunocompetente, la sola infección por HPV no parece ser suficiente para inducir el paso de CIN de alto grado a la invasión. Los estudios epidemiológicos que indican que la infección con los genotipos virales oncogénicos es por lejos más común que la neoplasia cervical sugieren la necesidad de cofactores en la carcinogénesis del

cuello de útero. El largo intervalo entre la infección inicial y la conversión maligna eventual sugiere que son necesarios otros acontecimientos para tal conversión, y la regresión espontánea de muchas lesiones primarias permiten inferir que la mayoría de los pacientes no se expusieron a estos acontecimientos. Esto es consistente con la noción de que el curso de las infecciones en los jóvenes es diferente a la de los adultos ya que en los últimos conlleva una mayor probabilidad de evolucionar a una forma de infección persistente y a cáncer (283).

En enfermedades multifactoriales como el cáncer la relación causa – efecto resulta difícil de establecer con exactitud, sin embargo, estudios epidemiológicos a nivel mundial, muestran evidencias de que ciertos factores locales (además de los sistémicos y ambientales) como el traumatismo repetido en el tiempo, las infecciones virósicas, micóticas y bacterianas, podrían favorecer el desarrollo de lesiones malignas de la cavidad bucal (289).

Si bien la relación del consumo del tabaco y de la ingesta de alcohol ya está probadamente asociada al cáncer bucal es interesante observar que en la población estudiada aumentan ambos factores de riesgo a medida que se progresa hacia la malignidad, así es que mientras que ninguno de los controles bebía alcohol habitualmente y sólo el 17% fumaba, el 40% de los pacientes con lesiones cancerizables fumaba y el 27% consumía alcohol, y el 56% de los enfermos con cáncer fumaba y el 39% consumía alcohol. **Tabla 10, fig. 30.**

Factores como el trauma, aún no han sido fehacientemente asociados a la carcinogénesis, sin embargo es conocido que el proceso de la cicatrización y la carcinogénesis tienen ciertas características biológicas comunes (140). Se ha demostrado que muchos de los mediadores químicos liberados por el tejido en vías de reparación inducen la neovascularización, la inflamación, la proliferación celular, la síntesis del colágeno y de otras sustancias de la matriz extracelular (290,291). La principal diferencia con las neoplasias malignas es la presencia en éstas de proliferación de células transformadas. En la población estudiada es importante destacar que 15 (100%) de los pacientes con lesiones precancerosas y 17 (94%) de los pacientes con carcinomas presentaron factores micro-traumatizantes crónicos comparados con 12 (52%) de los controles. Vale observar que en el grupo problema, lesiones cancerizables y cáncer, la irritación suave y repetida de la superficie de la erosión/ulceración

evita la extensión de las proyecciones epiteliales que emergen de los bordes acantósicos de la herida para cubrir el tejido de granulación, de este modo se interfiere con su maduración hacia la fibrosis y persiste la inflamación. Por el contrario, el tipo de trauma que reciben las lesiones que se tomaron como controles (quistes mucoides e hiperplasias fibrosas) permiten la organización del corion y la epitelización en la gran mayoría de los casos.

Entre los factores biológicos asociados a la carcinogénesis se ha mencionado la infección por HPV (157) y por cándida (147). Es conocido que la infección producida por el HPV produce hiperplasia epitelial, al igual que la infección con cándida (hiperplasia pseudo-epiteliomatosa). En el último caso esta infección se acompaña de inflamación teniendo el carácter de una displasia epitelial reversible con el tratamiento antifúngico específico.

Nuestros resultados muestran una asociación entre HPV, candidiasis, micro-traumatismos crónicos y carcinomas apareciendo las lesiones cancerizables como un paso intermedio **Tabla 10**. Es así que del 9% de los controles que presentaban candidasis, el porcentaje asciende al 47% en las lesiones premalignas y al 89% en las malignas, probablemente instalándose esta infección en el último grupo como resultado de la inmunosupresión local y sistémica ocasionada por la enfermedad cancerosa.

Numerosos estudios se han publicado en relación a la infección por HPV y otros factores carcinogénicos, así Chiominto y col. (292), en 1995, manifestaban que la evaluación estadística de los datos de su estudio demostró la carencia de la significación de la infección viral comparada a otros factores del riesgo y suponen que el HPV no desempeña un papel primario en la carcinogénesis oral, pero que es una causa concomitante con otros factores del riesgo

Sand y col. (245) no encontraron diferencia estadísticamente significativa entre el uso del tabaco y el alcohol y el predominio de HPV y si bien demostraron una asociación entre la infección por HPV y las lesiones orales estudiadas como leucoplasias, líquenes y cánceres sostienen que la influencia patógena de la infección con HPV sigue siendo confusa.

Por su parte, Zhang y col. (293) no encontraron ninguna asociación significativa entre la presencia de HPV y otros factores de riesgo, incluyendo el uso del tabaco y del alcohol, la localización del tumor, el grado histológico o el

estadio de TNM. Sin embargo, estos autores concluyen que los genomas HPV16/18 pueden actuar como cofactores en la carcinogénesis oral, particularmente en los pacientes de sexo masculino y de edades mayores o iguales a los 60 años; informando además que la infección por HPV se presenta comúnmente en la mucosa bucal normal.

En tanto Cianfriglia y col. (294), estudiando leucoplasias, papilomas y mucosas normales concluyen que, según sus resultados, el HPV es un factor de riesgo específico para el desarrollo de lesiones premalignas bucales. Otros como Kansky y col. (271), en un estudio en el cual realizaron una comparación entre las prevalencia del DNA de HPV en las muestras del tejido de los pacientes con carcinomas espinocelulares y los controles apareados por género y edad no encontraron diferencia significativa en el predominio del DNA-HPV entre ambos grupos de estudio. Sugieren entonces que los hallazgos ocasionales del DNA-HPV en especimenes del tejido de los carcinomas puedan ser el resultado de una colonización fortuita del HPV en la mucosa bucal, más bien que de la infección viral, y que los HPVs juegan de un papel limitado en la etiopatogénesis del carcinoma espinocelular de la mucosa bucal.

Más recientemente, Boy y col. (295) estudiaron el tumor y la mucosa bucal normal adyacente de 59 resecciones de CE primarios que fueron evaluados morfológicamente para la presencia de HPV usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, la hibridación in situ convencional (ISH), y una técnica de amplificación de la ISH (Dako GenPoint) detectando DNA-HPV18 en siete casos usando PCR y no encontraron ninguna positividad con las otras dos técnicas de ISH. Concluyen apoyando la visión que el HPV es probablemente poco importante en la patogénesis de OSCC y presumen que son las técnicas de detección del HPV como la razón principal para los resultados positivos en muchos estudios. Si bien confirman que la PCR es la técnica más sensible impulsan a los investigadores a incorporar controles internos terminantes al usar este método de detección.

Sin embargo Rosenquist K. (296), en un estudio que realizó en pobladores del sur de Suecia, concluyó que en esa población los resultados confirman que el tabaco fumado y el consumo de alcohol son factores de riesgo para desarrollar CE, por el contrario el uso del rapé húmedo sueco no tuvo ninguna

asociación. Los factores de riesgo independientes identificados fueron la mala higiene, el estado dental inadecuado y las dentaduras completas que funcionan incorrectamente. Entre otros factores posibles, la infección con HPV pareció ser la de mayor riesgo aumentando el riesgo relativo de recurrencia o de aparición de un segundo tumor primario.

Slaughter y col (85), por las observaciones realizadas en estudios experimentales, sostenían que el carcinoma epidérmico del epitelio escamoso estratificado bucal se origina por un proceso conocido como "cancerización del campo". Actualmente se cree que un sector del epitelio de la mucosa bucal iniciado puede evolucionar a cáncer favorecido por múltiples agentes co-carcinogénicos tales como los ya ampliamente establecidos tabaco, alcohol y además otros como la infección por HPV, infección por cándida y la irritación mecánica crónica (289). Esta última volvería determinadas áreas más susceptibles a la acción de carcinógenos. Las infecciones por HPV podrían iniciarse por abrasiones epiteliales mínimas ya que dichas heridas pequeñas brindarían acceso a los virus a la capa de células basales. El proceso de cicatrización de las heridas aceleraría la replicación viral ya que se ha observado recurrencia de verrugas genitales en los márgenes quirúrgicos (297). Estos conceptos explicarían la recurrencia de la enfermedad o la aparición de lesiones carcinomatosas ulteriores a la inicial. De este modo, de los 18 carcinomas estudiados en esta investigación el 33% (6/18) fueron cánceres desarrollados con posterioridad al diagnóstico y al tratamiento de la lesión primaria.

Teniendo en cuenta que en un sistema experimental sólo los queratinocitos humanos inmortalizados por el HPV se vuelven tumorigénicos en el ratón nude por medio de la exposición crónica a carcinógenos químicos es válido suponer que la infección de la mucosa con HPV podría aumentar la susceptibilidad de la misma a distintos carcinógenos y la naturaleza de los mismos podría variar de región a región y de acuerdo a los hábitos sociales y dietarios. Esta variación tanto de la incidencia de la infección con HPV así como la naturaleza de los agentes que actúan como iniciadores-promotores o como simples co-carcinógenos del CE podría ser importante a la hora de explicar la amplia variabilidad en la detección del HPV en los cánceres de cabeza y cuello alrededor del mundo. También es bien conocido a nivel experimental que el

intervalo de tiempo entre el uso de un agente carcinógeno y el desarrollo del cáncer varía junto con la intensidad de la exposición a un carcinógeno. Si la exposición al carcinógeno se da en un tiempo lo suficientemente prolongado se produce un cambio irreversible en las células de un área dada, de modo que la evolución hacia el cáncer llegue a ser inevitable.

El cáncer bucal es una causa importante de morbilidad y de mortalidad, especialmente en países en vías de desarrollo, y su predominio puede elevarse en el futuro próximo. A pesar de ello, actualmente, parece ser más importante realizar los exámenes pélvicos y de Papanicolau que mirar la boca, aunque la incidencia y la mortalidad para las malignidades bucales sea casi el doble de la del cáncer de cuello de útero. La cavidad bucal es realmente una de las pocas regiones que se puede examinar rutinariamente en la población asintomática permitiendo la detección de lesiones precancerosas o cancerosas en sus estadios más iniciales. Este hecho no debiera ser depreciado ya que el retraso en el diagnóstico del cáncer bucal está ligado principalmente a una carencia de la prevención y de la detección temprana por los profesionales de la salud, acompañados por una falta de la conciencia pública del cáncer bucal y sus factores de riesgo. Esto conduce a una situación donde muchos pacientes con lesiones pre-malignas o malignas son tratados equivocadamente por meses, incluso años, debido a los procedimientos empíricos inadecuados de los clínicos que no sospechan de su naturaleza precancerosa o cancerosa.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación nos permiten concluir que:

- Es aconsejable realizar mediante el raspado con espátula, la recolección de muestras de células de descamación de la mucosa bucal con la finalidad de detectar la presencia de HPV.

- La recolección de la muestra mediante la metodología de raspado permite un diagnóstico más certero de infección con HPV en comparación con la biopsia y representa una forma confiable para investigar las características biológicas de la infección por virus del papiloma humano, su historia natural y su relación con la carcinogénesis bucal.

- En concordancia con numerosos estudios anteriores a este, recomendamos la utilización de la citología exfoliativa por ser una metodología no invasiva porque ofrece la posibilidad de obtener material de grandes áreas de la mucosa bucal sin mayores molestias para el paciente, presentando valor como coadyuvante del juicio clínico.

- Es importante destacar la alta especificidad de la presunción clínica de infección con HPV observada en este estudio por lo cual podemos decir que lesiones blancas de aspecto húmedo extendidas en superficie, a veces alternando con áreas eritematosas, en ocasiones vegetantes o verrugosas, pueden ser un signo clínico de ayuda al estomatólogo en aquellas situaciones en que no puedan realizarse las pruebas de biología molecular, circunstancia ésta habitual en países en vías de desarrollo como el nuestro.

- El hallazgo de las manifestaciones sospechosas anteriormente descriptas en la mucosa bucal aún después del manejo adecuado de la enfermedad debe colocar al profesional en una actitud vigilante con respecto a la incidencia creciente de segundos carcinomas como resultado de la cancerización del campo, hecho que impone un esquema de seguimiento aún más estricto de estos pacientes.

- Si bien hay en la actualidad un comprensible entusiasmo en explotar la asociación entre la detección del HPV y las neoplasias de cabeza y cuello para mejorar la eficiencia de los programas de screening, debemos tener en cuenta que faltan conocimientos que permitan una mejor comprensión del desarrollo de la infección por HPV y de la historia natural de la misma, existiendo el riesgo de sumar aún mayor ansiedad a nuestros pacientes y enfrentando a los clínicos a numerosos dilemas, tales como distinguir infecciones con HPVs de alto riesgo o bajo riesgo, con baja vs. alta carga viral, latentes versus persistentes, etc. Es de esperar que muchos de estos dilemas se diluciden luego de estudios longitudinales y programas de vacunación a poblaciones que deberán ser monitoreadas a medida que pasen los años.

RESUMEN

Antecedentes: Varios estudios epidemiológicos han demostrado una amplia variación en el predominio del HPV en lesiones precancerosas y cancerosas bucales.

Métodos: Las biopsias y las citologías por raspado de lesiones bucales premalignas y malignas, fueron evaluadas para detectar el DNA de HPV por el análisis PCR- Southern-Blot.

Resultados: En 22 pacientes estudiados el 45,45% de las biopsias resultaron positivos al DNA de HPV, mientras que el 95-100% de las citologías fueron positivas (McNemar, $p < 0.0001$). La presunción clínica de infección con HPV detectó el 67% ($p < 0.0001$) de las casos positivos a la PCR comparada con el 48% ($p < 0.0001$) determinada por la citología y la histopatología. El predominio de HPV 6, 11, 16 y 18 en la mucosa oral fue estudiado en 59 individuos por medio de la citología. Mientras que sólo el 9% de los controles resultó HPV positivo, el 100% de los pacientes con lesiones potencialmente malignas y malignas fueron DNA de HPV positivos, y el genotipo que prevaleció fue el 16 seguido por el 18.

Conclusiones: La mayor detección de DNA-HPV en citologías por raspado que en biopsias sugiere que la información epidemiológica exacta sobre la infección con HPV depende no sólo de la técnica de detección del DNA sino también del procedimiento de muestreo.

Es destacar la alta especificidad de la presunción clínica de infección con HPV así como la asociación de las variables: infección con HPV, infección con cándida y microtraumatismo crónico en las lesiones precancerosas y cancerosas bucales estudiadas.

ABSTRACT

Background: Several epidemiologic studies have shown a broad variation in the prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral precancerous tissues and oral carcinomas.

Methods: Biopsies and superficial scrapes of lesions, clinically suspected of HPV infection or not, were taken from patients with potentially malignant and malignant oral lesions, and subject to HPV DNA detection by PCR–Southern blot analysis.

Results: From 22 patients with potentially malignant and malignant lesions analyzed, 45,45% of the biopsies were HPV DNA positive, whereas 95–100% of the superficial scrapes were positive (McNemar, $P < 0.0001$). Clinical presumption of HPV infection detected 67% ($P < 0.0001$) of the HPV DNA positive cases compared with 48% ($P < 0.0001$) determined by cytology and histopathology. The prevalence of HPV 6, 11, 16 and 18 in the oral mucosa was studied in 59 individuals. While 9% of normal controls were HPV DNA positive, 100% of the patients with potentially malignant and malignant lesions were HPV DNA positive, and the prevailing genotype was HPV 16 followed by HPV 18.

Conclusions: The higher HPV DNA detection rate in superficial oral scrapes than in biopsies suggests that accurate epidemiological information on oral HPV infection/oral carcinogenesis depends not only on the DNA detection technique, but also on the tissue/cell sampling procedure. It is to emphasize the high specificity of the clinical presumption of infection with HPV as well as the association of the variables: HPV infection, candidosis and chronic microtraumatisms in studied oral precancerous and cancerous lesions.

BIBLIOGRAFÍA

1. Shibuya K, Mathers CD, Boschi-Pinto C, Lopez AD, Murray CJ: Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of diseases 2000. BMC Cancer 26-12-2002; 2:37.

2. Globocan 2002. Disponible en http://www-dep.iarc.fr.

3. Shah JP, Johnson NW, Batsakis JG. Oral cancer. Taylor & Francis; 2003.

4. Jemal A, Murray T, Ward E, y col. Cancer statistics, 2005. CA Cancer J Clin 2005;55 (1):10–30.

5. Sapp PJ, Eversole LR, Wysocki GW.. Patología oral y máxilofacial contemporánea. Elsevier. Madrid. 2005.

6. Ackerman LV. Verrucous carcinoma of the oral cavity. Surgery 1948; 23: 670-8.

7. Rock JA, Fisher WR. Florid papillomatosis of the oral cavity and larynx. Arch Otolaryng 1960; 73:393.

8. Grinspan D. Enfermedades de la Boca. Tumores: Segunda Parte. Tomo V. 1ª edición. Edit. Mundi. Buenos Aires. 1984

9. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000;100:57-70.

10. Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN):1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. Oral Oncol 2000,36:311-27.

11. Binnie WH, Rankin KV. Epidemiology of oral cancer. In: Wright BA, Wright JM, Binnie WH, editors. Oral cancer: clinical and pathologic correlations. Boca Raton (FL): CRC Press, 1998.

12. Young Jr JL, Percy CL, Ardyce MS, y col. Cancer incidence and mortality in the United States, 1973-77. Washington, DC: US Government Printing Office; 1981. NCI Monograph no. 57.

13. Sciubba J J. Oral Cancer: Early Diagnosis and Treatment. Am J Clin Dermatol 2001; 2 (4).

14. Parkin DM, Pisan P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of twenty-five majors cancers in 1990. Int J Cancer 1999; 80:827-841.

15. Beenken SW, Urist MM. Head and neck tumor. In: Way LW, Doherty GM, editors. Current surgical diagnosis and treatment. 11th ed. New York: Lange Medicals Books/Mc Graw-Hill;2003.p.282-97.

16. Mignogna MD, Fedele S, Rossu LI. The World Cancer Report and the burden of oral cancer.Eur J Cancer prev 2004 Apr;13(2):139-142.

17. Franceschi S, Bidoli E, Herrero R, Muñoz N. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide. Etiological clues. Oral Oncol 2000, 36:106-115.

18. La Vecchia C, Lucchini F, Negri E, Levi F. Trends in Oral cancer mortality in Europe. Oral Oncol 2004; 40:433-9.

19. La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and Prevention of Oral Cancer. Oral Oncol, Vol. 33, N 5, pp.302-12, 1997.

20. Morelatto R, López de Blanc S. Mortalidad por cáncer bucal en la provincia de Córdoba, república Argentina (período 1975-2000). Estudio comparativo con otras poblaciones. Med Oral Patol Cir Bucal 2006, 11:E 230-235.

21. Gorsky M Epstein JB, Oakley C, y col. Carcinoma of the tongue: a cased series análisis of clinical presentation, risk factors, staging, and outcome. Oral Surg Oral med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004; 98:546-52.

22. Chen YK, Huang HC, Lin LM, Lin CC. Primary oral squamous cell carcinoma: an analysis of 703 cases in southern Taiwan. Oral Oncol. 1999 Mar;35(2):173-9.

23. Massano J, Regateiro FS, Januário G, Ferreira A. Oral Squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. . Oral Surg Oral med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004; 98:546-52.

24. Brandizzi D, Churchurro JA, Lanfranchi HE, Cabrini RL. Análisis of the epidemiological features of oral cancer in the city of Buenos Aires. Acta Odontol Latinoam. 2005;18(1):31-5.

25. Teppo L, Dickman PW, Hakulinen T, y col. Cancer Patient Survival – Patterns, Comparison, Trends. A population-based cancer Registry study in Finland. Acta Oncológica Vol. 38:283-294,1999.

26. González-García R, Naval-Gías L, Martos PL, y col. Melanoma of the oral mucosa. Clinical cases and review of the literature. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2005;10:264-71.

27. Colemann JJ, Sultan MR. Tumor of the head and neck. In: Schwartz SI, editor. Principles of Surgery. 7th edition. New York: MacGraw-Hill; 1999:601-65.

28. Centers for Disease Control and Prevention. Preventing and controlling oral and pharyngeal cancer. Recommendations from a national strategic planning conference. MMWR 1998;47(RR-14):1-12.

29. Parker S,Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statitics, 1997. CA Cancer J Clin 1997; 47:5-27.

30. De Cássia Braga Ribeiro K, Kowwalski LP, Dias de Oliveira BV. lmpact of comorbidity, symptons, and patients characteristics on the prognosis of oral carcinomas. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2000,129:1079-1085.

31. Gerson SJ. Oral Cancer. Crit Rev Oral Biol Med 1990;1:153-166.

32. Oliver AJ, Helfrick JF, Gard D. Primary oral squamous cell carcinoma: a review of 92 cases. J Oral Maxillofac Surg, 1996 Aug; 54(8):949-54.

33. Carvalho AL, Pintos J, Schlecht NF, y col. Predictive factors for diagnosis of advanced-stage squamous cell carcinoma of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2002 Mar; 128(3):313-8.

34. Corball AG, Morelatto R, López de Blanc S, y col. Correlación entre demora diagnóstica y estadio avanzado de neoplasias de cabeza y cuello. J Dent Res 2005 (370).

35. Allison P, Locker D, Feine JS. The role of diagnostic delays in the prognosis of oral cancer: a review of the literature. Oral Oncol 1998; 34:161-170.

36. Galmarini CM. Ciclo Celular en Bases de Oncología Molecular. Bonfil D, Scharovsky G y col. Ediciones Dunken. 1998;103-113.

37. Thomas A, Giesler T, White E. p53 mediates bcl-2 phosphorylation and apoptosis via activation of the Cdc42/JNK1 pathway. Oncogene 2000;19:5259-69.

38. Sanjuán NA. Oncogénesis viral en Bases de Oncología Molecular. Bonfil D, Scharovsky G y colaboradores. Ediciones Dunken Buenos Aires.1998; 41-56.

39. Park NH, kang Mk. Genetic inestability and oral cancer. Electronic journal Biotechnology 2000;3:66-71.

40. Das B, Nagpal JK. Understanding the biology of oral cancer. Med Sci Monit 2002;8:RA258-267

41. Beremblum I: The mechanism of carcinogenesis. a Study of the significance of cocarcinogenic action and related phenomena. Cancer Res 1: 807-814,1941.

42. Schulte-Hermann R, Grasl- kraupp B y Bursch W : Tumor development and apoptosis. Int Arch Allergy inmunol 105:363-367,1994.

43. Slaga TJ. Cellular and molecular mechanism involved in multistage skin carcinogenesis. En: aspects sk tumors. Experimental and clinical. Conti C, Slaga T, klein-Szanto AJP, eds. Raven Press, New York, 1989.pp 1-18.

44. Beremblum I. Sequencial aspects of chemical carcinogenesis: Skin. In: Cancer: a comprehensive treatise. Becker FF, ed. Plenum Press, New York, 2nd ed., vol.1, 1982 .45.

45. Hecker E, Fusening NE, Kunz W, Marks F and Thielmann HW, eds. Carcinogenesis: a comprehensive survey, vol 7. Raven Press, New York, 1982.

46. Weinstein IB; Horowitz AD, Fisher PB, Ivanovic V, Gattoni-Celli S and kirschmeier P: Mechanism of multistage carcinogenesis and their relevance to tumor cell heterogeneity. In: Tumor cell heterogeneity : Origins and implications. Owens AH, ed. Academic Press, New York, 1982, p 261.

49. Forastieri A, koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. N Engl J Med 2001; 345:1890-1900.

50. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990;61 (5):759–67.

51. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. Cancer Res 1996;56 (11):2488–92.

52. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. Cancer J Clin 2002;52 (4):195–215.

53. Dissemond J. Oral lichen planus: an overview. J Dermatolog Treat 2004;15 (3):136–40.

54. Reichart PA, Philipsen HP. Oral erythroplakia—a review. Oral Oncol 2005;41 (6):551–61.

55. VAN DER Waal I, y col. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. Oral Oncol 1997;33:291-301.

56. Scully C y col. Update on oral liquen planus: etiopathogenesis and managment. Crit Rev Oral Biol 1998; 9:86-122.

57. Grinspan D. Enfermedades de la Boca. Tomo II. Editorial Mundi. Buenos Aires. 1977.

58. WHO – Collaborating Center for Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1978;46:518-539.

59. Van der Meij EH, Bezemer PD, van der Waal I. Cost-effectiveess of screening for the possibledevelopment of cancer patients with oral lichen planus. Community Dent Oral Epidemiol 2002; 30:342-351.

60. Grinspan D. Enfermedades de la Boca. Tumores: Primera Parte. Tomo IV. 1ª edición. Edit. Mundi. 1982.

61. Waldron CA, Shafer WG. Leukoplakia revisited. A clinicopathologicç study 3256 oral leukoplakias. Cancer 1975;36 (4):1386–92.

62. Einhorn J, Wersall J. Incidence of oral carcinoma in patients with leukoplakia of the oral mucosa. Cancer 1967;20 (12):2189–93.

63. Bánóczy J. Follow-up studies in oral leukoplakia. J Maxillofac Surg 1977;5 (1):69–75.

64. Silverman S, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. Cancer 1984;53 (3):563–8.

65. Krutchkoff DJ, Eisenberg E. Lichenoid dysplasia: a distinct histopathologic entity. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1985;30:308-315.

66. Van der Meij EH, Schepman KP, van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Edodod 2003;96:164-171.

67. Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions. Significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. Crit Rev Oral Biol. Med 2003; 14:47-62.

68. Mattsson U, Jontell M, Holmstrup P. Oral lichen planus and malignant transformation: is a recall of patients justfied? Crit Rev Oral Biol. Med 2002; 13:262-267.

69. Larsson A, Warfvinge G. Malignant transformation of oral lichen planus. Oral Oncol 2003;39:630-631.

70. Mignogna MD, Lo Russo L, Fedele S, et al. Clinical behaviour of malignant transforming oral lichen planus. Eur J Oncol 2002;28(8):838-43.

71. Lanfranchi-Tizeira HE, Aguas SC, Sano SM. Transformación maligna del Liquen Plano Bucal Atípico. Análisis de 32 casos. Medicina Oral 2003; 8: 2-9.

72. Bornstein MM, kalas L, Altermatt HJ, Rees TD, Buser D. Oral lichen planus and malignant transformation: a retrospective follow-up study of clinical and histopathologic data. Quintessence Int 2006 Apr;37(4):261-71.

73. Axell T, Pindborg JJ, Smith CJ, Van der Waal I. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, may 18 21, 1994. International Collaborative Group on Oral White Lesions. J Oral Pathol Med 1996;25:49-54.

74. Suarez P, Batsakis JG, El-Naggar AK. Leukoplakia: still a gallimaufry or is progress being made? A review. Adv Anat Pathol 1998;5:137-154.

75. Hansen LS, Olson JA, Silverman S. Proliferative verrucous leukoplakia: a long term study of thirty patients. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1985;60.285-98.

76. Murrah VA, Batsakis JG. Proliferative verrucous leukoplakia and verrucous hyperplasia. Ann Otol Rhinol Laryngol 1994;103:660-3.

77. Shear M, Pindborg J. Verrucous hyperplasia of the oral mucosa. Cancer 1980;46:1855-62.

78. Rajendran R y colab. Ackerman's tumour (verrucous carcinoma) of the oral cavity: a histological study of cases. Singapore Dent J 1989;14:48-53

79. Lozada-Nur F, Miranda C. Oral lichen planus: epidemiology, clinical characteristics, and associated diseases. Semin Cutan Med Surg 1997;16 (4):273–7.

80. Mignogna MD, Muzio LL, Russo LL, et al. Clinical guidelines in early detection of oral squamous cell carcinoma arising in oral lichen planus: a 5-year experience. Oral Oncol 2001;37 (3):262–7.

81. Wilson E. Lecture on lichen planus. Journal of Cutaneous Medicine 1869; 3:117-32

82. Zhnag L, Rocín MP, Priddy R y col. Molecular análisis of oral lichen planus: a premalignant lesion?. Am J Pathol 1997;151:323-7.

83. Porter SR, Barret W, Olsen I, y col. Inmunological aspects of dermal and oral lichen planus: a review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1997;83:358-66.

84. Sudbø J. Novel management of oral cancer: a paradigm of predictive oncology. Clin Med Res 2004;2 (4):233–42.

85.Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. Cancer 1953;6 (5):963–8.

86. Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenho RH. A genetic explanation of slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. Cancer Res 2003;63 (8):1727–30.

87. Braakhuis BJM, Leemans CR, Brakenho RH. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications.J Oral Pathol Med 2004;33 (6):317–22.

88.Tabor MP, Brakenho RH, Ruijter-Schippers HJ, Wal JEVD, Snow GB, Leemans CR, et al. Multiple head and neck tumors frequently originate from a single preneoplastic lesion. Am J Pathol 2002;161 (3):1051–60.

89.Soni S, Kaur J, Kumar A, Chakravarti N, Mathur M, Bahadur S, et al. Alterations of rb pathway components are frequent events in patients with oral epithelial dysplasia and predict clinical outcome in patients with squamous cell carcinoma.

90. Weber RG, Scheer M, Born IA, Joos S, Cobbers JM, Hofele C, et al. Recurrent chromosomal imbalances detected in biopsy materialfrom oral premalignant and malignant lesions by combined tissue microdissection, universal DNA amplification, and comparative genomic hybridization. Am J Pathol 1998;153 (1):295–303.

91. Okafuji M, Ita M, Oga A, Hayatsu Y, Matsuo A, Shinzato Y, et al.The relationship of genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization to DNA ploidy and tumor size in human oral squamous cell carcinomas. J Oral Pathol Med 2000;29 (5):226–31.

92. Jiang WW, Fujii H, Shirai T, Mega H, Takagi M. Accumulative increase of loss of heterozygosity from leukoplakia to foci of early cancerization in leukoplakia of the oral cavity. Cancer 2001;92 (9):2349–56.

93. Rosin MP, Cheng X, Poh C, Lam WL, Huang Y, Lovas J, et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. Clin Cancer Res 2000;6 (2):357–62.

94.el Naggar AK, Hurr K, Batsakis JG, Luna MA, Goepfert H, Hu V. Sequential loss of heterozygosity at microsatellite motifs in preinvasive and invasive head and neck squamous carcinoma. Cancer Res 1995;55 (12):2656–9.

95. Bologna M, Sukumar S: kaleidoscope Nº 3:The oncogenes.S Rassu ed.,Gova, Italia,1993 pp3-96.

96. Bishop JM. Viral Oncogenes. Cell 1985;42:23-38.

97. Hunter,T. Cooperation between oncogenes. Cell 1991;64:249-270.

98. Sharp PA. Gene regulation and oncogenes. Cancer Res 1989;49:2188-2194.

99. Hansen MF y Cavene WK. Tumor supresor-recessive mutations that lead to cancer. Cell 1988; 53:172-173.

100. Nigro JM et al .Mutations en el p53 gene occur in diverse human tumor types. Nature 1989;342: 705-708.

101. Boquete A, Binda MM. Factores de crecimiento en Bases de Oncología Molecular. Bonfil D, Scharovsky G y colaboradores. Ediciones Dunken. 1998:133-148.

102. Normanno N, Luca AD, Bianco C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. Gene 2006;366 (1):2–16.

103. Ishitoya J, Toriyama M, Oguchi N, et al. Gene amplification and overexpression of EGF receptor in squamous cell carcinomas of the head and neck. Br J Cancer 1989;59 (4):559–62.

104. Nagatsuka H, Ishiwari Y, Tsujigiwa H, et al.Quantitation of epidermal growth factor receptor gene amplification by competitive polymerase chain reaction in premalignant and malignant oral epithelial lesions. Oral Oncol 2001;37(7):599-604.

105. Xia W, Lau YK, Zhang HZ, et al. Strong correlation between c-erbB-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 1997;3 (1):3–9.

106. Tsantoulis PK et al., Advances in the biology of oral cancer, Oral Oncol (2006), doi:10.1016/j.oraloncology.2006.11.010

107. Shang ZJ, Li ZB, Li JR. VEGF is up-regulated by hypoxic stimulation and related to tumour angiogenesis and severity of disease in oral squamous cell carcinoma: in vitro and in vivo studies. Int J Oral Maxillofac Surg 2006;35 (6):533–8.

108. Li C, Shintani S, Terakado N, Klosek SK, Ishikawa T, Nakashiro K, et al. Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and platelet-derived endothelial growth factor in oral squamous cell carcinomas. Int J Oral Maxillofac Surg 2005;34 (5):559–65.

109. Kishimoto K, Sasaki A, Yoshihama Y, Mese H, Tsukamoto G, Matsumura T. Expression of vascular endothelial growth factor-C predicts regional lymph

node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol 2003;39 (4):391–6.

110. Tanigaki Y, Nagashima Y, Kitamura Y, Matsuda H, Mikami Y, Tsukuda M. The expression of vascular endothelial growth factor-A and -C, and receptors 1 and 3: correlation with lymph node metastasis and prognosis in tongue squamous cell carcinoma. Int J Mol Med 2004;14 (3):389–95.

111. Moriyama M, Kumagai S, Kawashiri S, Kojima K, Kakihara K, Yamamoto E. Immunohistochemical study of tumour angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol 1997;33(5):369–74.

112. de Vicente JC, Fresno MF, Villalain L, Vega JA, Vallejo GH. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol 2005;41 (3):283–93.

113. Patel BP, Shah PM, Rawal UM, Desai AA, Shah SV, Rawal RM, et al. Activation of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral squamous cell carcinoma. J Surg Oncol 2005;90 (2):81–8.

114. Goldstein AM, Blot WJ, Greenberg RS, Schoenberg JB, Austin DF,Preston-Martin S, et al. Familial risk in oral and pharyngeal cancer. Eur J Cancer B Oral Oncol 1994;30B (5):319–22.

115. Brown LM, Gridley G, Diehl SR, Winn DM, Harty LC, Otero EB, et al. Family cancer history and susceptibility to oral carcinoma in Puerto Rico. Cancer 2001;92 (8):2102–8.

116. Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, Braakhuis BJ, de Vries N, van der Waal I, et al. Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1995;121 (2):157–60.

117. Foulkes WD, Brunet JS, Sieh W, Black MJ, Shenouda G, Narod SA.Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study. BMJ 1996;313 (7059):716–21.

118. Bongers V, Braakhuis BJ, Tobi H, Lubsen H, Snow GB. The relation between cancer incidence among relatives and the occurrence of multiple primary carcinomas following head and neck cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1996;5(8):595–8.

119. Ankathil R, Mathew A, Joseph F, Nair MK. Is oral cancersusceptibility inherited? Report of five oral cancer families. Eur J Cancer B Oral Oncol 1996;32B (1):63–7.

120. Scully C, Pri e SS, Cox MF, Maitland N . Evidence for infectious agents in the aetiology of oral cancer. In: Johnson NW, editor. Oral cancer: detection of patients and lesions at risk. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 96–113.

121. Roffo AH. Leucoplasie experimentale produit par le tabac. Rev. Stomat; 1930, 32:699.

122. Freedman A and Shklar G. Alcohol and hamster pouch carcinogenesis. Oral Surg, 1978; 46:794

123. Wynder E L. Etiological aspects of squamous cancer of the head and neck. J: Am. Med. Ass, 1961; 215:452.

124. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans Vol 83. Tobacco smoke and involuntary smoking// IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans 1986.

125. Zheng T, Holford T, Chen Y, Jiang P, Zhang B, Boyle P. Risk of tongue cancer associated with tobacco smoking and alcohol consumption. Oral Oncol 1997, 33(2):82.85.

126. De Stefani E, Boffetta P, Oreggia F, et al. Smoking patterns and cancer of the oral cavitiy and pharynx: a case-control study in Uruguay. Oral Oncol 1998; 34:340-346,

127. Moreno López LA, Esparza-Gómez GC, González-Navarro A, et al. Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral higiene: a case-control study in Madrid, Spain. Oral Oncol 2000;36:170-174,

128. Zavras AI, Douglass CW, Joshipura K, et al. Smoking and alcohol in the etiology of oral cancer: gender-specific risk profiles in the south of Greece. Oral Oncol 2001; 3:28-35,

129. Lissowska J, Pilarska A, Pilarska P, et al. Smoking, alcohol, diet dentition and sexual practices in the epidemiology of oral cancer in Poland. Eur J Cancer Prev 2003; 12:25-33,

130. Sánchez MJ, Martínez C, Nieto A, Castellsagué X, et al. Oral and oropharyngeal cancer in Spain: influence of dietary patterns. Eur J Cancer Prev 2003; 12:49-56.

131. Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez C, et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. Int J Cancer 2004; 108:741-749.

132. Warnakulasuriya S, Sutherland G, Scully C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. Oral Oncol 2005;41 (3):244–60.

133. Castellsagué, De Stefani, Talamini R, et al. Oral higiene, dentition, sexual habits and risk of oral cancer. Br J Cancer 2000; 83(9):1238-1242.

134. Hindle I, Downer M. C., Moles D. R. and Speight P. M. Is alcohol responsible for more intra-oral cancer. Oral Oncol 2000;36(4):328-333.

135. Fioretti F, Bosetti C, Tavani A, et al. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in never smokers. Oral Oncol 1999;35(4):375-378

136. Ogden GR. Alcohol and oral cancer. Alcohol 2005;35 (3):169–73.

137. Ewing J.The relation of trauma to malignant tumors. Am J Surg 1926;40 (2): 30-36.

138. Renstrup G, Smullow B, Glickman I. Carcinogenesis and mechanical irritation in the cheek pouch of the hamster. J. Dent. Res. 1961;40:649.

139. Monkman G, Orwoll G and Ivins JC: Trauma and oncogénesis. Mayo Clin Proc 1974;49:157-63.

140. Perez MA, Raimondi AR, e Itoiz ME. An experimental model to demonstrate the carcinogenic action of oral chronic traumatic ulcer. J Oral Pathol Med 2005; 34:17-22

141. Robinson S S and Tasker S, 1947. Cronic latent oral moniliasis (thrush). Arch. Derm., 55:85.

142. Cawson R and Lehner T,1968. Chronic hiperplastic candidasis. Candida Leukoplakia. Brit. J. Dermatol.89:497.

143. Renstrup G. Occurrence of Candida in oral leukoplakia. Acta Pathol Microbiol Scand 1970;78:421–424

144. Krogh P, Hald B, Holmstrup P.Possible mycological etiology of oral mucosal cancer: catalytic potential of infecting Candida albicans and other yeasts in production of N-nitrosobenzylmethylamine. Carcinogenesis. 1987 Oct;8(10):1543-8.

145. Zhang KH, Wang HJ, Qin JX Effect of candidal infection on the hyperplastic oral epithelium. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 29:339–341.

146. Barrett AW, Kingsmill VJ, Speight PM (1998). The frequency of fungal infection in biopsies of oral mucosal lesions. Oral Dis 4:26–31.

147.McCullough M, Jaber M, Barrett AW, Bain L, Speight P, Porter SR (2002). Oral yeast carriage correlates with presence of oral epithelial dysplasia. Oral Oncol 38:391–393.

148. Samaranayake LP, MacFarlane TW, editors. Oral candidosis. London: Butterworth. 1990.

149. Sitheeque MAM, Samaranayake LP. Chronic Hyperplastic Candidosis/Candidasis (Candidal Leukoplakia) Crit Rev Oral Biol 2003;14(4):253-267.

150. Heaton Cl. Clinical manifestation and modern management of condylomata acuminata: a dermatologic perspective. Am. J. Obstet. Gynecol. 1995,172: 1344- 1350.

151. Consilosi S. M., Madoff R. D. Current teraphy for recurrent and extensive anal warts. Dis Colon Rectum. 1995;38:1101-1107.

152. Syrja¨nen K, Syrja¨nen S, Lamberg M. et al. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. Int J Oral Surg 1983;12 (6):418–24.

153. de Villiers E M et al. Papilloma virus DNA in human tongue carcinomas. International Journal of Cancer;1985;36;575-578.

154. Zur Hausen H. Papillomaviruses infections- a major cause of human cancers. Biochimica et biophysica Acta 1996;1288:F55.

155. Miller CS and White DK. Human papiloma virus expresion in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma. A retrospective review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1996; 82; 57-68.

156. zur Hausen H. Molecular Pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. Curr Top Microbiol Immunol 1994; 186:131-56.

157. Scully C. Oncogenes, tumor suppressors and viruses in oral squamous cell carcinoma. Journal of Oral Pathology and Medicine 1993;22:337-47.

158. Scully C. Oral cancer: new insights into pathogenesis. Dental Update 1993;20:95-100.

159. Flaitz CM. Human papillomaviruses and oral disease. In: Sterling JC, Tyring JC, editors. Human papillomavirus: clinical and scientific advances. London: Chapman & Hall Publishers.

160. Flaitz CM, Hicks MJ. Role of lymphotropic herpesviruses in malignancies associated with immunosuppressed states. In: MillardHD,MasonDK, editors. Perspectives on 1998 ThirdWorld workshop on oral medicine. Univ of Michigan Press.

161. Bernstein DI, Schleiss MR. The growing family of herpesviridae. Seminars on Pediatric Infections and Disorders 1996;7:231-7.

162. Rickinson AB. Epstein-Barr virus in action in vivo. New England Journal of Medicine 1998;338:1461-3.

163. Grioths PD. Herpesviruses and AIDS. Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 1996;100(Suppl.):3-7.

164. Bals C, Santomasso B, Coso O, et al. G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. Nature 1998;391:86-9.

165. Levy JA. Three new human herpesviruses (HHV6, 7, 8). Lancet 1997;349:558-62.

166. Braun DK, Dominguez G, Pellett PE. Human herpesvirus 6. Clinical Microbiol Review 1997;10:521-67.

167. Flaitz CM, Hicks MJ. Molecular piracy: the viral link to carcinogenesis.Oral Oncol 1998; 34 :448-453

168. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses: Vol. 64 Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1995; IARC Scientific Publication.

169. Majewski S, Jablonska S. Skin autografts in Epidermodysplasia Verruciformis: Human Papillomavirus-associated Cutaneous Changes Over 20 Years for Malignant Conversion. Cancer Res 1997: 57; 4214-4216.

170. Stephen Tyring. Perspectives on Humanpapilloma virus infection. The American Journal of Medicine 1997. vol 102 (5A).

171. Koss LG, Durfee Gr. Unusual patterns of squamous ephitelium of the uterine cerviz: cytologic and pathologic study of koilicytic atypia. N N Y Acad Sci 1956;63:1245-61.

172. Komorowski Ra, Clowry LJ. Koilocytic atypia of the cervix. Obstet Gynecol 1976;540-4.

173. Dunn AEG, Ogilvie MM. Intranuclear virus particles in human genital wart tissue: observations on the ultrastructure of the epidermal layer. J Ultrastruct Res 1968; 22:282-95.

174. Grussendorf EL, zur Haussen H. Localization of viral DNA-replication in sections of human warts by nuclei acid hybriditation with complementary RNA of human papilloma virus type 1. Arch Dermatol Res 1979;25:383-92.

175. Kellokoski JK, Syrjanen SM, Chang F y colab. Southern blot hybridization and PCR in detection of oral human papilloma virus (HPV) infection in women with genital HPV infections. J Oral Pathol Med 1992;21:459-64.

176. Bustos DA, Grenón MS, Benítez MB, et al. Human Papillomavirus infection in Cyclosporin-Induced Gingival Overgrowth in Renal Allograft Recipients. J Periodontol 2001;72:741-744.

177. SYRJANEN SM. Human papillomavirus infection in the oral cavity. In: Papillomaviruses and human disease. Syrjanen K, Gissman L, Koss LG, eds. New York: Springer- Verlag, 1987; 104-137.

178. Chang F, Syrja¨nen SM ,kellokoskiJ, Syrja¨nen KJ. Human papillomavirus (HPV) infections and their assocations with oral disease. J Oral pathol Med 1991;20:305-17.

179. Shillitoe EJ. Relationship of viral infection to malignancies. Curr Opin Dent 1991;1:398-403.

180. Fornatora M. Human papillomavirus – associated oral ephytelial dysplasia (koilocytic dysplasia). 1996 Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod ; 82:47-56.

181. Pretorius-Clausen F. Geographical aspects of orla focal epithelial hyperplasia. Pathol Microbiol 1973;39:204-13.

182. Estrada L. Informe preliminar sobre algunos aspectos odontológicos de los indios caramanta. Bol Inst Antropol Medellín. Colombia.1960;7:198-210.

183. Sonería A, Fonseca N. Sobre una lesión de la mucosa oral en los niños indios de la Misión Los Angeles de Tokuko. Venez Odont 1964;29:109-22.

184. Archard HO, Heck JW, Stanley JR. Focal epithelial hyperplasia: an unusual oral mucosa found in Indian children. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1965;20:201-12.

185. Hernandez-Jáuregui P, Eriksson A, Tamayo Perez R, et al. Human papillomavirus type 13 DNA in focal epithelial hyperplasia among Mexicans. Arch Virol 1987;93:131-7

186. Roman C y colab. Multifocal papilloma virus ephitelial hyperplasia.Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1994;77:631-635.

187. Shah KV and Howley P. Papillomaviruses in Fields Virology, Cap 66. 3° edition Lippincot- Raven Publishers. Filadelfia. 1996.

188. Trofatter KF. Diagnosis of Human Papilomavirus Genital Tract Infection. Am J Med. 1997; 102(5A):21-27.

189. Brown DR, Fife KH. Human papilomavirus infections of the genital tract. Med Clin North Am. 1990;74:1455-1485.

190. Schneider A, Meinhardt G, de Villiers EM, y colab. Sensitivity of the cytologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with HPV-DNA hybridization studies. Diagn Cytopathol. 1987;3:250-255.

191. Lörincz At. Human papilomavirus detection tests. In: holmes KK. Mardh P-A, Sparling PF, Wiesner PJ, eds. Sexually Transmitted Diseases, 2nd ed. New York: Mc Graw Hill, 1990:953-59.

192. Bossio JC, Brawer R. Bases de Biología Molecular en Bases de Oncología Molecular. Ediciones Dunken 1998; 19-40

193. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol. 1975 Nov 5;98(3):503-17.

194. Reid R, Lorincz AT. Human papilloma virus tests. Ballière's Clin Obstet Gynaecol.1995;9:65-103.

195. Kuypers JM, Critchlow CW, Gravitt PE, et al. Comparison of dot filter hybridization, Southern transfer hybridization, and polimerase chain reaction amplification for diagnosis of anal human papillomavirus infection. J Clin Microbiol.1993;31:1003-1006.

196. Bustos DA, Pavan JV, Carricart S et al. Detección del Virus Papiloma Humano en Lesiones Cancerosas Orales en la Ciudad de Córdoba. Rev Fac Cienc Méd Córdoba 1999; 56(1):65-71.

197. Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidrans KY D (Eds.) World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. IARC Press Lyon, 2005.

198. Scully C, Elkom M. Lichen planus-review an update on pathogenesis. J Oral Pathol 1985;14:431-58.

199. Wahi PN, Cohen B, Ultra UK, et al. Histological typing of oral and oropharingeal tumours. Histological classification of tumours. Geneva: WHO, 1971;Nº 4.

200. Jacobson S, Shear M. Verrucous carcinoma of the mouth. J Oral Pathol 1972;1:66-75.

201. Koss LG. From koilocytosis to molecular biology: the impact of cytology on concepts of early human cancer. Mod Pathol 1989; 2:526-35.

202. Silverberg S, Ronald A, William J. Principles and Practice of Surgical Pathology and Citopathology ,Third Edition. New York: Churchill Livingstone, 1997: 1413-16, 1426.

203. Saiki R.K, Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Hora G.T., Erlich H.A., Arnheim N. Enzimatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230: 1350-54.

204. De Roda Husman A.M., Walboomers J.M.M., van den Brule A.J.C., Meijer C.J.L.M., Snijders P.J.F. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3` ends with adjacent higly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. Journal of general Virology 1995; 76: 1057-62.

205. Contorni M., Leoncini P. Typing of human papillomavirus DNAs by restriction endonuclease mapping of the PCR products. Journal of Virological Methods 1993; 41:29-36.

206. Nindl I., Lotz B., Kúhne-Heral R., Endisch U., Schneider A. Distribution of 14 high risk HPV types in cervical intraepithelial neoplasia detected by a non radioactive general primer PCR mediated enzyme immunoassay. J Clin Pathol 1999; 52: 17-22.

207. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J eds. Molecular Cloning, a laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbour: Laboratory Press. 1989.

208. Jacobs M.V., de Roda Husman A.M., Van Den Brule A.J.C., Snijders P.J.F., Meijer C.J.L.M., Walboomers J.M.M. Group Specific differentiation between High and Low Risk Human Papillomavirus Genotypes by General

primer mediated PCR and two Cocktails of oligonucleotides probes. J.C. Microbiology; Apr 1995: 901-5.

209. D´Costa J., Saranath D., Dedhia P., Sanghvi V., Mehta A.R. Detection of HPV 16 genome in human oral cancers and potentially malignant lesions from India. Oral Oncology 1998; 34: 413-20.

210. Agresti A. Categorical data análisis. New york: John Wiley & Sons, Inc., 2000. pp 710.

211. Johnson, R. A. and D. W. Wichern. (1998). Applied Multivariate Statistical Analysis. Fourth Edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 816pp.

212. Syrja¨nen K, Syrja¨nen S, Lamberg M,, et al. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. Int J Oral Surg 1983;12 (6):418–24.

213. Lutzner, M. The Human Papiloma Viruses. A Review. Arch Dermatol 1983;119:631:35.

214. Eversole LR, Laipis PJ. Oral squamous papillomas: Detection of HPV DNA by in situ hybridization. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1988;65:545-50.

215. Scully , Cox MF, Prime SS, et al. Papillomaviruses: The current status in relation to oral disease. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1988;65:526-32.

216. Scully C, Epstein J, Porter S. Viruses and chronic disorders involving the human oral mucosa. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1991;72:537-44.

217. Premoli de Percoco G, Christensen R. Human papillomavirus in bucal verruca, papillary lesions: a comparative histological, clinical and inmuno histochemical study. J Pathol 1992; 84:383-92.

218. Syrjanen S.Human papillomavirus infections and oral tumors.Med Microbiol Immunol. 2003 Aug;192(3):123-8.

219. Lawton G.M., Thomas S.J., Schonrock J., Monsour F.N., Frazer I.H. Prevalence of genital human papillomaviruses in normal oral mucose: a comparison of methods for sample collection. J. Oral Pathol Med 1992; 21: 265-69.

220. Kurose K, Terai M, Soedarsono N, et al. Low prevalence of HPV infection and its natural history in normal oral mucosa among volunteers on Miyako island, Japan. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004 Jul 98(1): 91-96

221. Terai M, Hashimoto K, Yoda K, et al. High prevalence of human papillomaviruses in the normal oral cavity of adults. Oral Microbiol Inmunol1999;14:201-205.

222. Summersgill KF, Smith EM, Levy BT, et al. Human papillomavirus in the oral cavities of children and adolescents. . Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001;91:62-69.

223. Lambropoulos AF, Dimitrakopoulus J, Frangoulides E, et al. Incidente of human papillomavirus 6,11,16,18 and 33 in normal mucosa of a Greek population. Eur J Oral Sci 1997;105:294-297.

224. Eike A, Buchwald C, Rolighed J et al. Human papillomavirus (HPV) is rarely present in normal oral and nasal mucosa. Clin Otoralyngol 1995;20:171-173.

225. Surgiyama M, Bhawal UK, Dohmen T, et al, Detection of human papillomavirus -16 and Hpv-18 DNA in normal, dysplastic, and malignant oral ephitelium. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003;95:594-600

226. Miller C.S., Johnstone B.M. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis, 1982-1997. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001; 91: 622-35.

227. Gillison ML, Koch WM, Capone RB et al. Evidence for a casual association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. J Natl Cancer Inst 2000 May 3; 92 (9): 709-20

228. Kashima HK, Kutcher M, Kessis T, et al. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma, leukoplakia, lichen planus and clinically normal epithelium of the oral cavity. Ann Otol Rhinol Laryngol 1990;99:55-61.

229. Syrjanen SM, Syrjanen KJ, Happonen RP. Human papillomavirus (HPV) DNA sequences in oral precancerous lesions and squamous cell carcinoma demonstrated by in situ hibridization. J Oral Pathol 1988;17:273-8.

230. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. J Natl Cancer Inst 2000 Dec 3; 95 (23): 1772-83.

231. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasión from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst 2000 May 3; 92 (9): 690-8.

232. Sindo M, Chiba I, Yasuda M, et al. Detection of human papillomavirus DNA sequences in oral squamous cell carcinoma and their relation to P53 and proliferating cell nuclear antigen expresión. Cancer 1995;76:1513-21.

233. Gassenmaier A, Hornstein OP. Presence of human papillomavirus DNA in benign and precancerous oral leukoplakias and squamous cell carcinomas. Dermatologica 1988;176 (5):224–33.

234. Chatterjee R, Mukhopadhyay D, Chakraborty RN, Mitra RB. Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in oral carcinomas in relation to human papillomavirus infection and cytokinetics. J Oral Pathol Med 1997;26 (7):310–4.

235. Woods KV, Shillitoe EJ, Spitz MR, Schantz SP, Adler-Storthz K. Analysis of human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas. J Oral Pathol Med 1993;22 (3):101–8.

236. Elamin F, Steingrimsdottir H, Wanakulasuriya S, Johnson N, Tavassoli M. Prevalence of human papillomavirus infection in premalignant and malignant lesions of the oral cavity in UK subjects: a novel method of detection. Oral Oncol 1998;34(3):191–7.

237. Snijders PJ, Scholes AG, Hart CA, Jones AS, Vaughan ED, Woolgar JA, et al. Prevalence of mucosotropic human papillomavirusesin squamous-cell carcinoma of the head and neck. Int J Cancer 1996;66 (4):464–9.

238. Koh JY, Cho NP, Kong G, Lee JD, Yoon K. p53 mutations and human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinoma: correlation with apoptosis. Br J Cancer 1998;78 (3):354–9.

239. Riethdorf S, Friedrich RE, Ostwald C, Barten M, Gogacz P, Gundlach KK, et al. p53 gene mutations and HPV infection in primary head and neck squamous cell carcinomas do not correlate with overall survival: a long-term follow-up study. J Oral Pathol Med 1997;26 (7):315–21.

240. Miguel RE, Villa LL, Cordeiro AC, Prado JC, Sobrinho JS, Kowalski LP. Low prevalence of human papillomavirus in a geographic region with a high incidence of head and neck cancer. Am J Surg 1998;176 (5):428–9.

241. Cruz IB, Snijders PJ, Steenbergen RD, Meijer CJ, Snow GB, Walboomers JM, et al. Age-dependence of human papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinomas. Eur J Cancer B Oral Oncol 1996;32B (1):55–62.

242. Ostwald C, Rutsatz K, Schweder J et al. Human papillomavirus 6/11, 16 y 18 in oral carcinomas and benign oral lesions. Med Microbiol Inmunol (Berl)2003 aug. 192 (3):145-8.

243. De Petrini M, Ritta M, Schena M, Chiusa L, Campisi P, Giordano C, Landolfo V, Pecorari G, Landolfo S. Head and neck squamous cell carcinoma: role of the human papillomavirus in tumour progression. New Microbiol. 2006 Jan;29(1):25-33.

244. Ibieta BR, Lizano M, Fras-Mendivil M, Barrera JL, Carrillo A, Ma Ruz-Godoy L, Mohar A. Human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma in a Mexican population. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005 Mar;99(3):311-5.

245. Sand L, Jalouli J, Larsson PA, et al. Human papilloma viruses in oral lesions. Anticancer Res. 2000 Mar-Apr;20(2B):1183-8.

246. Chen PC, Pan CC, Kuo C, Lin CP, et al.Risk of oral nonmalignant lesions associated with human papillomavirus infection, betel quid chewing, and cigarette smoking in Taiwan: an integrated molecular and epidemiologic study. Arch Pathol Lab Med. 2006 Jan;130(1):57-61.

247. Dahlgren L, Dahlstrand HM, Lindquist D, et al. Human papillomavirus is more common in base of tongue than in mobile tongue cancer and is a favorable prognostic factor in base of tongue cancer patients. Int J Cancer. 2004 Dec 20;112(6):1015-9.

248. Zhang ZY, Sdek P, Cao J, Chen WT. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa.Int J Oral Maxillofac Surg. 2004 Jan;33(1):71-4.

249. Howley PM. Papillomaviridae and their Replication. In: B.N. Fields, Knipe DM et al. Virology. Chapter 65, 3rd edn.New York: Raven Press.

250. Syrjanen K., Syrjanen S. Concept of the existence of human papillomavirus DNA in histologically normal squamous epithelium of the genital tract should be re-evaluated. Acta Obstet Gynecol Scand 1989; 68: 613-7.

251. Lench N, Stainer P, Williamson R. Simple non-invasive method to obtain DNA for gene analysis. Lancet 1988;1:1356-8.

252. Giovanelli L, Campisi G, Lama A, et al. Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions, J Infect Dis 2002 Mar 15; 185 (6):833-6.

253. Campisi G, Giovanelli L, Arico P, et al. HPV DNA in clinically differetvariants of oral leukoplakia and lichen planus. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004 Dec; 98 (6):705-11.

254. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, et al. Human papillomavirus oral exfoliated cells and risk of head and neck cancers. J Natl Cancer Inst 2004 Mar 17; 96 (6): 449-55.

255. Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. J Natl Cancer Inst 1998 Nov 4; 90 (21): 1626-36.

256. Brandsma JL, Abramson AL. Association of papillomavirus with cancers of head and neck. Arch Otolaryngol head neck Surg 1989: 115:621-5.

257. Giovannelli L, Campisi G, Colella G, et al. Brushing of oral mucosa for diagnosis of HPV infection in patients with potentially malignant and malignant oral lesions. Mol Diagn Ther. 2006;10(1):49-55.

258. Winning TA, Townsend GC. Oral mucosal embriology and histology. Clin Dermatol 2000 Sep-Oct; 18 (5): 499-511.

259. Ogden GR, Cowpe JG, Green M. Cytobrush and wooden spatula for oral exfoliative cytology: a comparison. Acta Cytol 1992 Sep-Oct; 36 (5):706-10.

260. Ostwall C, Muller P, Barten M, Rutsatz K, Sonnenburg M, Milde-Langosh K. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosa . J Oral Pathol Med 1994;23:220-225.

261. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, et al. Human papillomavirus oral exfoliated cells and risk of head and neck cancers. J Natl Cancer Inst 2004 Mar 17; 96 (6): 449-55.

262. Klussmann Jp, Weissenborn SJ, wieland U, et al. Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. Cancer 2001 Dec 1; 92 (11): 2875-84.

263. Koppikar P, de Villiers EM, Mulherkar R. Identification of human papillomaviruses in tumors of the oral cavity in an Indian comunity. Int J Cancer 2005 Mar 1; 113 (6): 946-50.

264. Meisels A, Roy M, Fortier M. Human papillomavirus infectious of the cervix: the atypical condyloma. Acta Cytol 1981;25:7-16.

265. Orth G. Papillomaviruses-Human: General Features. Infections of the anogenital tract. Enciclopedy of Virology. Academic Press. 1994. Edited by R. Webster and A Granoff. Vol 2:1013-1026.

266. Yarandi F, Izadi Mood N, Mirashrafi F. Colposcopic and histologic findings in women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. Aust N Z J Obstet Gynaecol. 2004 Dec;44(6):514-6

267. Laurent R. Genital papillomavirus infections. Rev Prat. 1996 Oct 15;46(16):1961-8.

268. Handsfield HH. Clinical presentation and natural course of anogenital warts.Am J Med. 1997 May 5;102(5A):16-20

269. Ponten J, Guo Z. Precancer of the human cervix. Cancer Surv. 1998;32:201-29.

271. Kenneth F, Trofatter JR. Diagnosis of human papilloma-virus genital tract infection. Am J Med 1997; 102: 21-5

272. Kansky AA, Poljak M, Seme K, Kocjan BJ, Gale N, Luzar B. Human papillomavirus in oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosa. Acta Virol 2003; 47:11-16.

270. Bouda M, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG, Giannoudis A, Tsoli E,Danassi-Afentaki D, et al. ‘‘High risk’’ HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. Mod Pathol 2000;13(6):644–53.

273. Mork J, Lie K, Glattre E, et al. Human Papillomavirus infection as a Risk Factor For Squamous- Cell Carcinoma of the Head and neck. N Engl J Med 2001; 344:1125-31.

274. Mao E. Prevalence of Human Papillomavirus 16 and nucleolar organizer region counts in oral exfoliated cells from normal and malignant epithelia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1995,80:320-9

275. De Villiers E-M, Weidauer H, Otto H, Zur Hausen H. Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas.International Journal of Cancer 1985;36:575-8

276. Maitland NJ, Cox MF, Lynas C, et al. Detection of human papillomavirus DNA in biosies of human oral tissue. British Journal of Cancer 1987;56:245-50.

277. Ferenczy A, Bergeron C, Richard RM. Human papillomavirus DNA in fomites on objects used for the managment of patients with genital human papillomavirusinfection. Obstet Gynecol 1989;74:950-4.

278. Kwok S, Giguchi R. Avoiding false positivties with PCR. Nature 1989; 339:237-238.

279. Chang F, Syrjanen S, Nuutinen J et al. Detection of human papillomavirus (HPV)DNA in oral squamous cell carcinomas by in situ hybridization and polymerase chain reaction. Arch Dermatol. Res 1990;282:493-97.

280. Lind Po, Syrjanen SM, Syrjanen KJ, et al. Local inmunoreactivity and human papillomavirus (HPV) in oral precancer and cancer lesions. Scan J Dent 1986;94:419-26.

281. zur Hausen H, ed. Human pathogenic papillomaviruses. Heidelberg: Springer-Verlag, 1994.

282. Schneider A, Koutsky LA. Natural history and epidemiological features of genital HPV infection In: Muñoz N, Bosch FX, Shah KV, Meheus A, eds. The epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer. (IARC Sci Publ 119) lyon: IARC, 1992.

283. Cox JT. Epidemiology of cervical intraepithelial neoplasia: the role of human papillomavirus. Baillieres Clin Obstet gynaecol. 1995 Mar;9(1):1-37.

284. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, et al. Worldwide distribution of Human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys. A pooled análisis. Lancet 2005;366:991-98.

285. Walter H, Matsumoto H, Danker-Hopfe H, De Stefano GF, RickardsO.GM and KM allotypes in nine population samples of Sicily. Ann Hum Biol 1997; 24:419 -26.

286. Aggelopoulou EP, Skarlos D, Papadimitrou C, Kittas C, Troungos C. Human papillomavirus DNA detection in oral lesion in the Greek population. Anticancer Res 1999;19:1391-1396.

287. Scano G, Martinez-Labarga C, Taraborelli T, Gruppioni G, De Stefano GF. Genetic history of the population of Puglia (southern Italy). Gene Geogr 1995; 9:25 40274.

288. Quint WGV, Scholte G, Van Doom LJ, Kleter B, Smits PHM, Linderman J. Comparative analysis of human papilloma virus infections in cervical scrapes and biopsy especimens by general SPF10 PCR and HPV genotyping. J Pathol 2001,194:51:58.

289. Premoli Percoco G, Ramirez JL. High risk human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinoma: evidence of risk factors in a Venezuelan rural population . Preliminary report. J Oral Pathol Med. 2001;30:355-61.

290. Murphy MS, Summaria LJ, Miller RJ, Wyse TB, Godsschmidt RA, Scan lon EF. Inhibition of tumor implantation at sites of trauma by plasminogen actvators. Cancer 1991; 68:1724-30.

291. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vacular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. Am J Pathol 1995; 146: 1029-39.

292. Chiominto A, Giannoni M, Ventura L, Ranieri A. Epidermoid carcinoma of the oral cavity. Considerations of the role of The papillomavirus Minerva Stomatol. 1995 Mar;44(3):127-32.

293. Zhang ZY, Sdek P, Cao J, Chen WT. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. Int J Oral Maxillofac Surg. 2004 Jan;33(1):71-4.

294. Cianfriglia C, Cianfriglia F, Di Gregorio DA, et al. Incidence of human papillomavirus infection in oral leukoplakia. Indications for a viral aetiology. J Exp Clin Cancer Res. 2006 Mar;25(1):21-8

295. Boy S, Van Rensburg EJ, Engelbrecht S, Dreyer L, van Heerden M, van Heerden W. HPV detection in primary intra-oral squamous cell carcinomas--commensal, aetiological agent or contamination? J Oral Pathol Med. 2006 Feb;35(2):86-90.

296. Rosenquist K. Risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. Swed Dent J Suppl. 2005;(179):1-66.

297. Frenzy A, Mitao M, Silverstein SJ, et al. Latent papillomavirus and recurring genital warts. N Engl J Med 1985; 313:784-8.