



Universidad
Nacional
de Córdoba



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESCUELA DE POSGRADO

**“ESTUDIO DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN
PACIENTES CON CÁNCER BUCAL. RELACIÓN CON
FACTORES DE RIESGO”**

TESISTA:

OD. MARÍA INÉS CRISCUOLO.

DIRECTOR:

DR. SILVIA LÓPEZ DE BLANC

CÓRDOBA, 2016



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
Escuela de Posgrado

**Estudio del virus del papiloma humano en pacientes con
cáncer bucal. Relación con factores de riesgo.**

Trabajo de tesis para optar al Título de Doctor en Odontología

Od. María Inés Criscuolo

Director: Prof. Dra. Silvia López de Blanc

Asesor: Prof. Dra. Cecilia Cuffini

2016

COMISIÓN DE TESIS:

Prof. Dra. Marta Contigiani

Prof. Dra. Ruth Ferreyra de Prato

Prof. Dra. Perla Hermida Lucena

JURADO:

Prof. Dra. Marta Contigiani

Prof. Dra. Ruth Ferreyra de Prato

Prof. Dra. Livia Escovich

A las luces que guían mi vida, Martina y María

INDICE

	Pág
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
OBJETIVOS.....	24
PACIENTES Y MÉTODO.....	25
RESULTADOS.....	30
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIONES.....	54
BIBLIOGRAFÍA.....	55
ANEXOS	
Glosario.....	64
Consentimiento informado general.....	66
Consentimiento informado estudio poblacional.....	69



Por el presente este Comité Institucional de Ética en Investigación en Salud (CIEIS) de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba, deja constancia que el Protocolo: "Prevalencia del Virus del Papiloma Humano (HPV) en pacientes con cáncer bucal", presentado por la Od. María Inés Criscuolo y dirigido por la Prof. Dra. Silvia López de Blanc, cumple con las pautas y normas bioéticas vigentes.

En la Ciudad de Córdoba, a los 5 días del Mes de Octubre de 2011

Dra. Alicia del V. Simbrón
Subcoordinadora
Comité Institucional de Ética en Investigación en Salud
Facultad de Odontología U.N.C

RESUMEN

Las investigaciones sobre el virus del papiloma humano (VPH) comenzaron a generar mayor interés cuando se demostró la relación de ciertos tipos de VPH con el carcinoma de cuello de útero. En la actualidad son numerosos los estudios que encuentran asociación con otras localizaciones como la orofaringe, cavidad bucal, laringe entre otras. Sin embargo, el conocimiento sobre el rol del virus en el proceso de carcinogénesis bucal continúa siendo un tema que requiere ser analizado en profundidad, según las características epidemiológicas de la población y de su asociación con otros factores de riesgo. **Objetivo:** Estudiar la presencia de VPH en la cavidad bucal de pacientes con cáncer bucal y relacionar con factores de riesgo. **Pacientes y Métodos:** Se realizó un estudio de tipo caso-control. Se conformaron tres grupos: **Grupo carcinoma (GC):** pacientes con diagnóstico de Carcinoma a células escamosas bucal (CCEB) o carcinoma verrugoso (CV), **Grupo no carcinoma (GNC):** pacientes con lesiones no neoplásicas, no sugestivas de infección por el VPH y **Grupo control voluntarios sanos (GCVS):** voluntarios, apareados por sexo y edad con el GC. Se obtuvieron cuatro muestras de cada paciente del GC y el GNC: saliva, raspado de la lesión mediante citobrush, raspado del contra lateral sano a la lesión y biopsia de lesión que fue fraccionada en dos partes, para estudio anatomopatológico y para PCR. En el grupo de voluntarios sanos, se obtuvieron dos muestras, saliva y muestra del borde posterior de lengua, bilateral, mediante citobrush. **Resultados:** Se detectó VPH en el 42% de los pacientes del GC, en el 34% del GNC y en el 4% de los voluntarios sanos. Al comparar la presencia del virus entre GC y GNC la diferencia no fue estadísticamente significativa. Pero entre el GC y el de voluntarios sanos el Odds Ratio fue de 16, 43(IC: 5,10-52,94) $p < 0,0001$, resultando altamente significativo. El 80% del GC presentó más de una muestra positiva, predominando en muestras de saliva (67%); en el 40% se detectaron genotipos de alto riesgo, siendo el 50% VPH 16. En el GNC el 57% fueron genotipos de bajo riesgo. En el GC el 99% presentó al menos un factor de riesgo y el 6% presentó VPH de alto riesgo como único factor asociado. El virus se asoció al consumo de tabaco, de alcohol y al traumatismo crónico en un 36% de los pacientes. **Conclusión:** El virus del papiloma humano, en la cavidad bucal se presenta como una infección multifocal, es un factor de riesgo para lesiones bucales y en

particular para carcinomas. El VPH 16 fue el genotipo de alto riesgo más frecuente. Generalmente se lo encontró asociado a otros factores como tabaco, alcohol y trauma. En nuestro medio el VPH es poco prevalente a nivel bucal, lo que revela la importancia del control de pacientes con lesiones bucales, principalmente con desórdenes potencialmente malignos VPH positivos. La localización en lengua, sitio expuesto al trauma dentario o protético, puede favorecer el ingreso del virus al epitelio. Resulta de interés profundizar el conocimiento en ésta área que permita revelar la implicancia de la presencia del virus en saliva.

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) investigations started to generate more interest since the relationship between some types of HPV with cervical carcinoma was demonstrated. Nowadays an association with other sites like oropharynx, oral cavity, larynx and others has been found. Nevertheless, the role of the virus in oral carcinogenesis continues to be a topic that requires analysis, in relation to epidemiological characteristics and their association with others risk factors. **Objective:** To study HPV oral presence, in patients with oral cancer and the relationship with other risk factors. **Patients and Methods:** A case-control study was performed with three groups: **Carcinoma Group** (CG): patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC) or verrucous carcinoma (VC), **Non Carcinoma Group** (NCG): patients with lesions not neoplastic, not HPV infection suggestive and **Healthy Volunteers Control Group** (HVCG): volunteers were matched by sex and age with CG. Four samples of each patient were obtained from CG and NCG: saliva, scraped off the lesion with citobrush, scraped of contralateral healthy site and biopsy that was fractionated in two parts, for anatomopathological study and for PCR. From healthy volunteers group two samples was obtained, saliva and scraped of lateral site of the tongue, bilateral, with citobrush. **Results:** HPV was detected in 42% of CG, in 34% of NCG and 4% in HVCG. A significant difference between the presence of HPV comparing CG and NCG was not found. But the Odds Ratio for the association between HPV and the occurrence of cancer (CG and healthy voluntarees group) was highly significative: 16, 43(IC: 5, 10-52, 94) $p < 0, 0001$. Additionally, 80% of CG presented more than one positive sample, predominating in saliva (67%); in 40% high risk genotypes was detected, and 50% was HPV 16. In NCG 57% was low risk genotypes. In CG 99% presented one risk factor at least and in 6% high risk HPV was the only associated factor. The virus was associated with tobacco / alcohol consumption and chronic trauma in 36% of patients. **Conclusion:** Human papillomavirus in oral cavity is present like a multifocal infection and is a risk factor for oral lesions in particular for carcinomas. HPV 16 was the most frequent high risk type. Usually it was associated with other factors like tobacco, alcohol and trauma. In our population HPV is little prevalent in oral cavity, what shows the importance of control patients with oral lesions, mainly with HPV positive potentially malignant disorders. Tongue localization,

an exposed tooth or prosthetic trauma site, may allow the entry of the virus to the epithelium. Further studies would be important in relation to the presence of the virus in saliva and its clinical implications.

INTRODUCCIÓN

Las investigaciones sobre el virus papiloma humano (VPH) comenzaron a generar mayor interés a nivel mundial cuando se demostró la relación de ciertos tipos de VPH con el carcinoma de cuello de útero, uno de los cánceres más frecuentes en mujeres. En la actualidad son numerosos los estudios que encuentran asociación con otras localizaciones como la orofaringe, cavidad bucal, fosa nasal y laringe entre otras localizaciones de cabeza y cuello (1, 2, 3). Sin embargo, el conocimiento sobre el rol del virus en el proceso de carcinogénesis bucal es incompleto y continúa siendo un tema que requiere ser analizado en profundidad, según las diferentes características epidemiológicas de la población y de su asociación con otros factores de riesgo (4, 5, 6).

Cáncer bucal

El carcinoma de cabeza y cuello ocupa el sexto lugar dentro de las neoplasias malignas que ocurren en países desarrollados, de los cuales el 50% son carcinomas bucales (CB) y éstos, están dentro de los diez tumores más frecuentes en países en vías de desarrollo (2). De acuerdo con las estadísticas mundiales (GLOBOCAN 2012), se estimaron 300.400 nuevos casos y 145.400 muertes por cáncer bucal (incluyendo cáncer de labio) ocurridas en 2012 en todo el mundo. El análisis de las tasas de incidencia y mortalidad fueron de 5,0 y 2,8 (cada 100000 habitantes) respectivamente para individuos de sexo masculino en áreas menos desarrolladas y de 7,0 y 2,3, respectivamente en individuos de áreas desarrolladas. En individuos de sexo femenino se observaron valores inferiores de tasas de incidencia y mortalidad, 2,6 y 0,6 respectivamente en mujeres de áreas más desarrolladas y de 2,5 y 1,4 para mujeres de áreas menos desarrolladas (7). **Tablas 1 y 2**

Tabla 1. Tasas de Incidencia, Mortalidad, para sexo masculino y probabilidad acumulativa de desarrollar cáncer a la edad de 75 años, por localización del cáncer para regiones más y menos desarrolladas.

	AREAS MAS DESARROLLADAS				AREAS MENOS DESARROLLADAS			
	INCIDENCIA		MORTALIDAD		INCIDENCIA		MORTALIDAD	
HOMBRES	RES	RA%	RES	RA%	RES	RA%	RES	RA%
Todos los cánceres	308,7	30,9	138	14,3	163	16,6	120,1	12
Cerebro, sistema nervioso	5,9	0,6	4	0,4	3,3	0,3	2,6	0,3
Colorectum	36,3	4,3	14,7	1,6	13,7	1,6	7,8	0,8
Esofago	6,4	0,8	5,2	0,6	10,1	1,2	9	1
Linfoma Hodgkin	2,3	0,2	0,4	0	0,8	0,1	0,4	0
Laringe	5,1	0,6	2,2	0,3	3,5	0,4	2	0,2
Labio, cavidad bucal	7	0,8	2,3	0,3	5	0,6	2,8	0,3
Pulmón	44,7	5,4	36,8	4,4	30	3,3	27,2	2,9
Melanoma de piel	10,2	1,1	2	0,2	0,8	0,1	0,4	0
Nasofaringe	0,6	0,1	0,2	0	2	0,2	1,3	0,2
Linfoma No Hodgkin	10,3	1,1	3,5	0,4	4,3	0,5	2,8	0,3
otros, faringe	4,7	0,6	2,2	0,3	2,8	0,3	2,2	0,3
Próstata	69,5	8,8	10	0,8	14,5	1,7	6,6	0,6
Testículo	5,2	0,4	0,3	0	0,7	0,1	0,3	0

RES: Riesgo de edad estandarizado (1000.000) RA: Riesgo acumulado % a los 74 años

(de GLOBOCAN 2012)

Tabla 2. Tasas de Incidencia, Mortalidad, para sexo femenino, por localización del cáncer para áreas más y menos desarrolladas.

	AREAS MAS DESARROLLADAS				AREAS MENOS DESARROLLADAS			
	INCIDENCIA		MORTALIDAD		INCIDENCIA		MORTALIDAD	
MUJERES	RES	RA%	RES	RA%	RES	RA%	RES	RA%
Todos los cánceres	240,6	23,3	86,2	9	135,8	13,4	79,8	8,1
Cerebro, sistema nervioso	4,4	0,4	2,7	0,3	2,7	0,3	1,9	0,2
Mama	74,1	8	14,9	1,6	31,3	3,3	11,5	1,2
Cuello uterino	9,9	0,9	3,3	0,3	15,7	1,6	8,3	0,9
Colorrectum	23,6	2,7	9,3	1	9,8	1,1	5,6	0,6
Cuerpo uterino	14,7	1,8	2,3	0,3	5,5	0,6	1,5	0,2
Esófago	1,2	0,1	0,9	0,1	4,1	0,5	3,6	0,4
Linfoma Hodgkin	1,9	0,2	0,3	0	0,5	0	0,3	0
Laringe	0,6	0,1	0,2	0	0,4	0,1	0,3	0
Labio, cavidad bucal	2,6	0,3	0,6	0,1	2,5	0,3	1,4	0,2
Pulmón	19,6	2,4	14,3	1,7	11,1	1,2	9,8	1
Melanoma de piel	9,3	0,9	1,2	0,1	0,7	0,1	0,3	0
Nasofaringe	0,2	0	0,1	0	0,8	0,1	0,5	0,1
Linfoma No Hodgkin	7,1	0,8	2	0,2	2,8	0,3	1,8	0,2
Otros, faringe	0,8	0,1	0,3	0	0,7	0,1	0,5	0,1

RES: Riesgo de edad estandarizado (1000.000) RA: Riesgo acumulado % a los 74 años

(de GLOBOCAN 2012)

En la tabla 2 el cáncer de labio se suma al cáncer de cavidad bucal, lo cual explica el aumento que se observa en la sobrevida, ya que el cáncer de labio tiene una sobrevida más alta que el resto de las localizaciones bucales.

Si comparamos las tasas de incidencia y mortalidad para el sexo femenino en regiones menos desarrolladas, el CB presenta valores superiores de mortalidad al melanoma considerado uno de los cánceres de peor pronóstico del organismo (8).

En un estudio realizado en la provincia de Córdoba sobre mortalidad por CB en el período 1975-2000 (Morelatto y col, 2006), se observó que el porcentaje de la tasa de mortalidad por neoplasias malignas de todo el organismo se incrementó en un 6,6%, mientras que por tumores bucales el aumento fue del 66% en el mismo período. Esta tasa, aumentó entre 1975-2000 en hombres, un 59% hasta el año 1995 y luego fue bajando gradualmente; en el caso de las mujeres se observó un aumento gradual que llegó al 77%. Sobre un total de 1005 defunciones por CB en este período, la localización más frecuente fue la lengua (43,5%) en ambos sexos (9).

Este incremento del CB principalmente en mujeres, que puede apreciarse también a nivel mundial, fue lo que nos motivó a estudiar más en detalle los factores de riesgo de nuestro medio y entre ellos el VPH. También nos resultó interesante analizarla localización del CB ya que se considera a los de lengua y amígdala como los carcinomas más relacionados con el VPH. Incluso se atribuye a este virus, el incremento de CB en algunos países como Finlandia, Suiza, Países Bajos, Reino Unido y Escocia (2,10). En países como Estados Unidos, donde existe una disminución en el consumo de tabaco, la incidencia de CB también se ha incrementado y autores como Patel SG y col. (2011) lo asocian a la infección por el VPH de los carcinomas de lengua, principalmente en mujeres jóvenes (11, 12).

Según la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE) el CB incluye las siguientes localizaciones: labios, lengua, glándulas salivales, paladar, encía, piso de boca, mucosas yugales, orofaringe y otras localizaciones intraorales. Sin embargo, al referirnos al CB, hablamos de carcinoma a células escamosas bucales (CCEB) ya que éste comprende el 90% de las lesiones malignas orales cualquiera sea su localización (13).

El CCEB involucra estadios graduales transicionales, que van de epitelio sano a formas malignas que llevan a la metástasis regional y a distancia, siendo numerosas las alteraciones celulares y genéticas para su desarrollo y progresión. Estos cambios celulares, pueden manifestarse clínicamente con la apariencia de lesiones cancerizables o desórdenes potencialmente malignos.

Principalmente son dos tipos de genes involucrados en la carcinogénesis bucal: los genes supresores de tumor, que cuando se inactivan promueven el crecimiento tumoral

y los oncogenes que al activarse favorecen éste crecimiento; ambos fenómenos conducen a la pérdida del control del ciclo celular. Algunos conocidos supresores tumorales son los inhibidores kinasacyclin-dependientes, Tp53 y retinoblastoma RB1 y oncogenes como los factores receptores de crecimiento epidérmico (EGFR) y el oncogen RAS (14).

Factores de riesgo para CB

Son múltiples los factores que intervienen en la etiología del CCEB. El consumo de tabaco y alcohol constituyen factores ampliamente estudiados, a nivel mundial (15, 16, 17). Se sabe que, a pesar de ser capaces de producir alteraciones en forma independiente, poseen un efecto de sinergismo que incrementa el riesgo. En relación al tabaco, éste varía según el tipo de tabaco, la forma de fumar y la cantidad, ya que existe una relación dosis efecto que se aprecia tanto en relación al promedio individual de cigarrillos fumados por día, a la cantidad de años de fumar y a la cantidad total de cigarrillos fumados en la vida (18). El aumento en la incidencia de CCEB en algunos países, ha sido atribuido al menos en parte, al aumento en el consumo de alcohol. Se cree que el riesgo es dosis-dependiente siendo menos importante el tipo de bebida alcohólica consumida, aspecto que está aún en discusión (19).

Con la evidencia de que algunos carcinomas se desarrollan en pacientes no fumadores y no bebedores (20), las investigaciones se han orientado en profundizar los estudios que permitan identificar y ampliar los conocimientos de los agentes o co-factores que contribuyan al desarrollo del CB, llamados factores emergentes (21, 22).

Se ha estudiado el uso de colutorios con contenido alcohólico y autores como Winn y col. (23) sugiere que un enjuague bucal que contiene 25% de etanol, utilizado en forma regular durante un período de tiempo, podría provocar un daño en la mucosa, similar al de una bebida alcohólica. Sin embargo investigaciones posteriores establecen que no existirían evidencias científicas para avalar este concepto, ya que los resultados presentados no son estadísticamente significativos y no se puede confirmar que exista una causa-efecto entre el uso de colutorios de contenido alcohólico y el CB (24, 25).

Un factor considerado de riesgo para el tracto digestivo superior y el CB es el consumo

de bebidas regionales no alcohólicas como la yerba mate, en países sudamericanos, como Brasil, Uruguay y Argentina. Se cree que consumido a altas temperaturas produciría cambios en los tejidos que facilitarían el efecto de carcinógenos como el tabaco y el alcohol. Autores como Golozar A, y col (26), estudiaron su relación al cáncer teniendo en cuenta los altos niveles de hidrocarburo aromático policíclico (HAP) en la yerba mate, que tendría un rol carcinogénico principalmente en esófago, y sugiere que disminuir los niveles de HAP reduciría las probabilidades de cáncer. Sin embargo las evidencias son limitadas ya que la mayor dificultad radica en establecer medidas cuantitativas para medir y comparar su consumo y determinar su efecto en forma independiente a otros factores (27, 28).

El trauma crónico de la mucosa bucal es un factor controversial en estudio. Puede definirse como el resultado de una irritación en forma permanente de un agente que puede ser el borde de un elemento dentario en mal posición o con un borde filoso, defectos en la superficie de las prótesis o hábitos parafuncionales capaces de generar lesiones intrabucales. Este factor puede actuar como promotor en el proceso de transformación maligna, especialmente en localizaciones favorables como borde de lengua y en asociación con otros carcinógenos (29).

También “una condición bucal deficiente” ha sido relacionada al CB, que incluye pérdida de elementos dentarios, enfermedad periodontal y una higiene escasa. Se han estudiado incluso de manera independiente a factores como tabaco y alcohol (30). La mala higiene bucal y la pérdida de elementos dentarios pueden asociarse a una flora que incrementa el efecto de reducción de productos nocivos como el nitrito o en la producción de acetaldehído, un metabolito del alcohol conocido por su efecto carcinogénico (31, 32). Así también una respuesta inflamatoria crónica en un terreno predispuesto genéticamente y expuesto a las toxinas microbianas del medio, podría cumplir un rol en el desarrollo de la carcinogénesis (33).

Son numerosos los agentes infecciosos que han sido estudiados como causantes o colaboradores de algunos cánceres específicos a nivel mundial. La cavidad bucal hospeda una gran variedad de microorganismos que incluyen bacterias, virus y hongos. La *Candida albicans spp* es comensal normal de la población sana, sin embargo, la acción de factores locales y/o generales facilitan la conversión de la cándida en un

agente patógeno. Algunos autores sugieren que el potencial de la *cándida spp* en la producción de un agente carcinogénico como la nitrosamina, puede contribuir a cambios displásicos en el epitelio. Sin embargo estudios recientes concluyen que el efecto no sería directo sino existen otros factores involucrados que actúen en conjunto al proceso infeccioso, principalmente el tabaco (34).

Los virus asociados a diferentes cánceres del organismo representan un grupo heterogéneo de virus. Según zur Hausen, Premio Nobel de Medicina 2008, (35) el 20% de todos los cánceres humanos están relacionados a una etiología viral. Entre los llamados virus oncogénicos están el virus del papiloma humano (VPH), el virus Epstein-Barr y el herpes virus humano tipo 8, los virus de la hepatitis B (hepatocarcinomas) y C, el poliomavirus humano, recientemente identificado, el retrovirus humano T-linfotrópico tipo 1 (HTLV-1) y el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 y 2 (VIH), además de algunos retrovirus endógenos (36). De estos virus, el VPH, adquiere una mayor relevancia en el grupo por su rol en el desarrollo del carcinoma de cuello de útero y su asociación al CCEB (37).

Los primeros en publicar evidencias de la relación del VPH como factor involucrado en la etiología del CB, fue S Syrjänen et al, en 1983, y luego ampliamente estudiado por numerosos autores (38, 39, 40, 41, 42).

Virus del papiloma humano (VPH)

Historia

La naturaleza infecciosa de verrugas humanas y animales, fue demostrada a comienzos del siglo XX. La primera visualización por microscopía electrónica de las partículas virales en verrugas humanas se registró en 1949. A pesar de que en 1930 Rous y colaboradores demostraron en modelos experimentales animales, el potencial oncogénico viral, la aparente naturaleza benigna del virus resultó en escasas investigaciones en años subsiguientes. El interés fue aumentando gradualmente en la década de los 70', cuando se hallaron técnicas moleculares necesarias para su detección (43). Se organizó así, el primer encuentro (workshop) de papilomavirus, donde se planteó la hipótesis de que este virus jugaba un rol importante en la etiología del cáncer.

En los 80' la situación cambió abruptamente por el aislamiento de los subtipos 6 y 11 en verrugas genitales y los subtipos 16 y 18 en biopsias de cáncer de cuello de útero (44, 45). Esto resultó en una rápida expansión de trabajos científicos. Hoy en día el principal interés radica en dilucidar el rol y los mecanismos del virus del papiloma humano en la carcinogénesis (46, 47, 48).

Generalidades

Los VPH representan un grupo heterogéneo de pequeños virus que pertenecen a la familia papiloma viridae. Son virus de genoma ADN, no envueltos, epiteliotrópicos, muy resistentes que infectan piel y mucosas e inducen a la proliferación celular (49). Los virus papiloma que afectan al ser humano comprenden cinco géneros evolutivos, que presentan características particulares en su ciclo celular, tropismo epitelial variable y asociación a diferentes enfermedades (50, 51). (Figura 1)

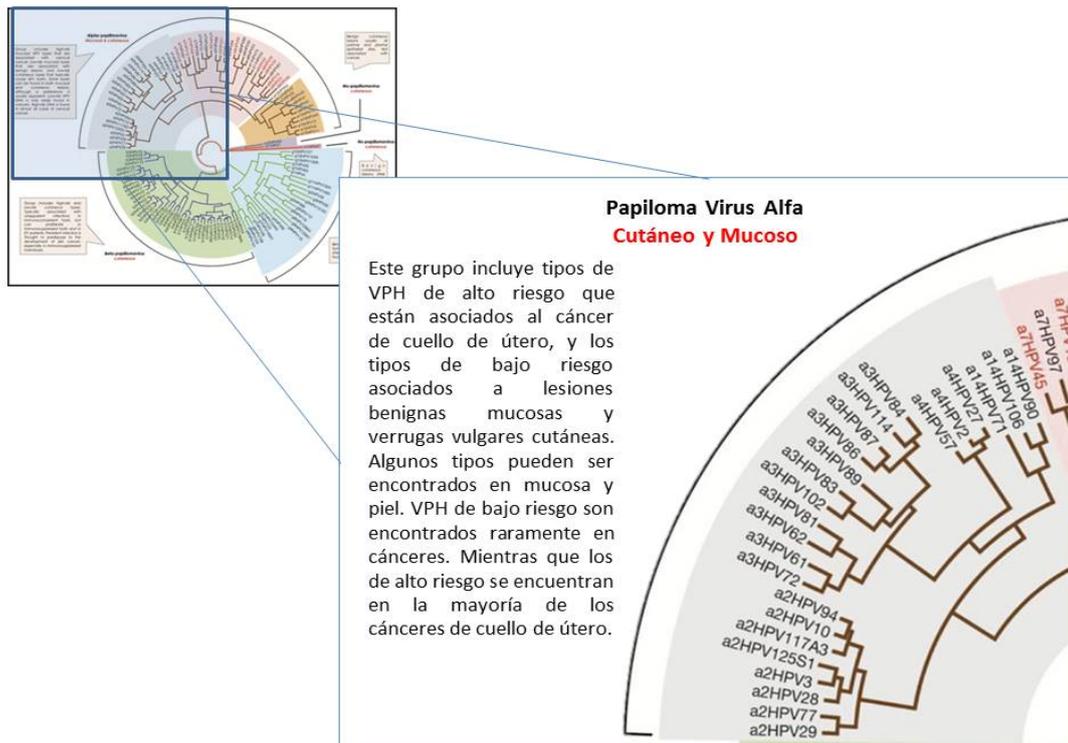


Figura 1: Relación evolutiva entre los diferentes Papilomavirus humanos. (J. Doobar y col/ Vaccine 30S (2012) F55-F70)

Los más estudiados son los del género Alpha que causan lesiones cutáneas y mucosas. Cada virus se adapta a su huésped, y puede cumplir su ciclo celular y mantenerse en la población sin ocasionar enfermedad aparente. Esta característica sugiere que la interacción papilomavirus-huesped es muy antigua y a través del tiempo ha generado un equilibrio entre la replicación viral y la tolerancia inmune. En los humanos los papilomavirus que preocupan son aquellos que producen lesiones persistentes, clínicamente visibles principalmente los de mucosa genital y bucal (52, 53).

Según el análisis de la secuencia de ADN viral del gen L1 de la cápside protéica (el gen más conservado del genoma), los Alpha se han subdividido en genotipos de alto o bajo riesgo según su comportamiento clínico sobre los tejidos infectados (54, 55).

Cada genotipo tiene diferente tropismo celular, lo cual permite la asociación de ciertos tipos de VPH, con tipos clínicos específicos de lesiones, principalmente verrugosas. A la vez el tropismo puede ser cutáneo, mucoso o cutáneo-mucoso. Por ejemplo el VPH 1 está asociado a verrugas plantares, el 2 y 4 con verrugas vulgares de manos, 6 y 11 con verrugas genitales y 16 y 18 con verrugas genitales y cáncer de cuello uterino.

Estructura viral de VPH asociado a mucosas

El VPH, es un pequeño virus, de 55 nm de diámetro. Su genoma es una molécula de ADN de doble cadena circular cerrado superhelicoidal, asociado a histonas celulares, constituido por 7200 – 8000 pares de base de ADN que contienen más de 10 zonas de lectura abierta. La cápside protéica de simetría isocáedrica está formada por 72 capsómeros, sin envoltura.

El genoma puede dividirse en tres regiones: una región larga de control (LCR: Long Control Region) que contiene 10% del genoma, una región temprana (E: Early) donde se regulan funciones de persistencia del genoma replicación de ADN viral y activación del ciclo lítico y una región tardía (L: Late) donde se codifican proteínas estructurales, utilizadas en la cápside viral y en la producción de nuevos virus (56).

La LCR contiene numerosos sitios de unión para activadores y represores de la

transcripción y podría tener un papel en el rango de los hospedadores de VPH. En esta región se expresan los genes E6 y E7 los cuales están involucrados en los VPH considerados oncogénicos (1). E6 es un oncogen viral que permite la replicación del virus. Tiene la capacidad de inmortalizar y transformar la célula. Se une a p53 y forma un complejo que provoca su degradación. En los queratinocitos p53 pasa de una vida media de varias horas a 20 minutos. E7 también es un oncogen viral que se une a las proteínas de la familia Rb (oncosupresoras) y las secuestra induciendo inestabilidad genómica (aneuploidia) (57).

En la región temprana (E) se sintetizan las siguientes proteínas:

E1: Codifica proteínas necesarias para la replicación extracromosomal y el ciclo viral.

E2: Codifica proteínas necesarias para la replicación extracromosomal y el ciclo viral. Además codifica dos proteínas que inhiben/activan la transcripción de la región E, por lo que esta zona debe ser eliminada en la progresión del carcinoma.

E3: no está determinada su función

E4: Actúa en la maduración y replicación del virus. Regula la expresión de los genes tardíos (L). Induce el colapso de la red de queratina citoplasmática en los queratinocitos antes de la liberación.

E5: es un oncogen viral con débil capacidad transformante.

En la región tardía (L) se expresan los genes tardíos L1 y L2. L1, es la proteína mayor de la cápside; se sintetiza en estadios tardíos de la replicación y contiene los epítopes neutralizantes y la secuencia codificante. Es una de las más conservadas entre las diferentes especies de VPH. L2 es una proteína menor de la cápside. Interactúa con L1, interviene en el ensamble viral e interactúa con actina y tubulina. Al igual que L1 se sintetiza en estadios tardíos de la replicación (58).

La Figura 2 es un esquema de la estructura genómica de VPH 16.

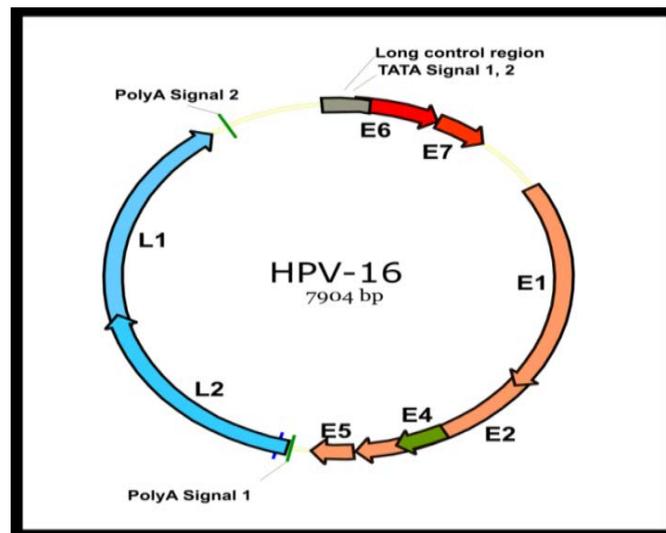


Figura 2: Esquema de la estructura genómica de VPH16

Características de la infección por VPH

Al igual que en la mucosa genital, las células indiferenciadas del estrato basal del epitelio, son las primeras en tomar contacto con el virus. Esto implica la existencia previa de una pérdida de sustancia superficial o micro abrasión sobre la superficie epitelial, que posibilita el ingreso del virus (19). Existe una hipótesis general de los últimos tiempos que la lesión inicial que comienza con la infección de la célula madre basal depende de la longevidad de esta célula como factor crucial para la formación de una lesión persistente (57, 58).

Las células epiteliales del estrato basal presentan una conformación diferente del VPH que las células superficiales adyacentes. De este modo en las células basales se expresan las proteínas no estructurales y sin síntesis de viriones. La multiplicación del ADN viral en este estrato ocurre de modo independiente a la mitosis celular. A medida que la célula se va diferenciando comienza la síntesis de proteínas estructurales. Es decir que la partícula completa, aparece solo en las células de los estratos epiteliales apicales. De esta manera, la replicación viral ocurre en la capa más diferenciada del epitelio escamoso, mientras que las transcripciones de ADN y ARN virales para la expresión genética temprana se hallan en la capa basal. Este vínculo entre la replicación viral y la

diferenciación celular progresiva es responsable del fracaso de cultivo en sistemas celulares in vitro para VPH (59). Además esto supone una estrategia del virus para permanecer en un tejido de activa multiplicación celular (60, 61)

Una evasión efectiva de la respuesta inmune innata y un retraso de la respuesta inmune adaptativa parece ser la característica de la infección por VPH. Ya que el virus infecta células epiteliales no vascularizadas, donde brota por su superficie apical, las células infectadas que expresan abundantes proteínas virales, son arrojadas hacia las capas superficiales del epitelio, distante del sistema inmune circulante, por lo cual no hay viremia. Además, la ausencia de muerte celular y de una respuesta inflamatoria acompañada de una inmuno-modulación viral que suprime la síntesis de interferón 1 en las células infectadas, crea un ambiente de citoquinas para las células de Langerhans y las pocas células dendríticas epiteliales de carácter tolerogénico. Todo esto hace que el VPH sea un microorganismo “exitoso” para la infección (62).

Para los genotipos de alto riesgo del género alfa, muchos de estos mecanismos de evasión inmune han sido establecidos, sobre todo para VPH 16, lo cual justifica su capacidad de persistencia. A pesar de esto, en muchos casos las lesiones son transitorias y resueltas exitosamente. Esto requiere de una infiltración de células T en el sitio de infección cumpliendo un rol importante las células de Langerhans como presentadoras del antígeno (63, 64, 65).

Muchos de los virus ADN pueden permanecer en estado de latencia después de la infección primaria, que puede durar entre 15 y 40 años, durante el cual el genoma viral se integra en el cromosoma de la célula huésped y no hay replicación viral. Algunos de estos virus producen una infección transitoria, superficial; otros permanecen latentes y pueden reactivarse en forma silenciosa, replicarse y liberarse, pero sin causar síntomas clínicos, o pueden reactivarse para causar enfermedad (62). Un bajo porcentaje de individuos infectados, desarrolla una neoplasia. Es decir que el cáncer no aparece como resultado de un proceso agudo. En esta situación en las células transformadas por VPH, la dinámica de expresión proteica cambia. Se expresan algunas proteínas tempranas que mantienen el fenotipo transformado en la célula, mientras que aquellas que conforman la arquitectura del virus, las proteínas tardías cesan su expresión. En las células cancerosas no hay síntesis de agente infeccioso. Es decir que el tejido con cáncer no es

reservorio del microorganismo. Quizá en esto radica la dificultad para identificar los agentes infecciosos relacionados al cáncer.

Métodos de diagnóstico para VPH

La elección de los métodos por los cuales podemos realizar el diagnóstico virológico de VPH va a depender del objetivo y la disponibilidad del laboratorio. Entre ellos la microscopía electrónica, es un método rápido pero requiere alto número de viriones. La citología exfoliativa y la histología de un corte de biopsia, son accesibles pero detectan solo infección productiva y la inmunohistoquímica también detecta infección productiva y antígeno común de género pero no tipifica.

El diagnóstico por detección de ADN viral, es la detección de secuencias genómicas de VPH y se basa en la amplificación de fragmentos blancos por reacción en cadena de polimerasa (PCR) o por hibridación. Existen numerosos métodos para detección de ADN todos con sus ventajas y desventajas. La detección por PCR, resulta una prueba sensible para la detección del virus en cualquier tipo de muestra y ha cobrado importancia en los últimos tiempos, dado que el virus no necesariamente debe estar intacto para inducir enfermedad. Se basa en el uso de los llamados primers genéricos MY09/MY11 que permiten amplificar un fragmento de aproximadamente 450 pares de bases correspondientes a la región L1 del genoma viral. La tipificación puede realizarse mediante el análisis del producto amplificado por restricción enzimática (RFLP), usando siete endonucleasas distintas. Cada tipo viral puede diferenciarse por un patrón de bandas característico (60).

VPH en mucosa sana vs CCEB

Los hallazgos de VPH en mucosa sana son controversiales, ya que diferentes autores reportan una variación de 0 a 80% (66,67, 68). Este rango tan amplio puede depender de las diferencias que se encuentran tanto en la población estudiada como en la sensibilidad de los métodos de detección utilizados (69), además es posible que existan zonas geográficas endémicas de VPH (3). Sin embargo, los resultados presentados a nivel mundial, demuestran siempre mayores porcentajes de infección por VPH en

pacientes con CCEB que en controles sanos (12, 63).

Ezquenazi D y col (70), estudiaron una población de voluntarios heterosexuales jóvenes del sur de Brasil (n=100) sin lesiones clínicas bucales ni de orofaringe. El rango de edad fue de 20 a 31 años, la mayoría (97%) eran no fumadores y bebedores ocasionales. Se realizó un cuestionario, un examen completo de cavidad bucal y se recolectaron muestras mediante citobrush de mucosa oral realizándose técnica de PCR. Estos autores hallaron todas las muestras negativas para VPH y adjudican el resultado al nivel socioeconómico medio-alto del grupo estudiado, la buena alimentación, los hábitos sexuales y el escaso consumo de tabaco y alcohol. Por otro lado, Teray M y col. (Japón) estudiaron una población adulta de 37 voluntarios con un rango de 22 a 48 años, que al examen clínico no presentaron lesiones bucales. Tomaron muestras de mucosa oral mediante hisopo y las analizaron con técnica PCR. Sus resultados mostraron que el 81% (30/37) de los voluntarios fueron VPH positivos y el genotipo más frecuente fue el 18 (87%). Estos autores concluyen que existe un gran número de población sana que podría presentar una infección por VPH en forma subclínica. Sin embargo no analizan la presencia o asociación con otros hábitos o factores de riesgo en la población estudiada (71).

En una revisión bibliográfica retrospectiva realizada por Miller C S y col (1996), sobre la expresión del VPH en mucosa normal y CCEB, observaron que la prevalencia promedio de VPH fue 13,5%, con un rango de 0 a 60%, y los genotipos detectados fueron: de alto riesgo 16 y 18 en el 53%, de bajo riesgo en el 42% 6 y 11. En carcinomas in situ, hallaron al 18,5% VPH positivos, predominando en mujeres y en lengua. Los genotipos 16 y 18 se detectaron en el 75% de las muestras positivas. Los CCEB analizados fueron positivos en un 26% con un rango de 0% a 100% y el VPH 16 detectado en el 80% de las muestras. En relación a los factores de riesgo asociados en este grupo el 87% de los VPH positivos estuvo asociado al consumo de tabaco y alcohol, mientras que el VPH se presentó como único factor de riesgo en el 7%. Concluyen que si bien es alta la prevalencia de VPH en CCEB, el virus no actuaría en forma independiente sino en asociación a tabaco y alcohol para el desarrollo del CB (72). Sin embargo este mismo autor (Miller CS y col) en un meta-análisis posterior (2001) analizó trabajos publicados entre 1997-1982 sobre detección de VPH en mucosa sana, leucoplasia, carcinoma verrugoso, carcinoma in situ y CCEB, aquí afirma lo

contrario “que el virus podría actuar como un factor independiente” para el CCEB. Sus resultados indican que en lesiones potencialmente malignas fue 2 a 3 veces más probable detectar el VPH, y que en el CCEB 4 a 7 veces más cuando se comparaba con mucosa sana. El OR para CCEB fue 5,37 (95% CI, 2,49-11,55) en relación a la mucosa sana. Los genotipos más frecuentes fueron 16 y 18 (73). Estos datos concuerdan con la última revisión publicada por S Syrjänen (2011) en el cual muestra una fuerte asociación entre VPH 16 y CCEB en comparación con controles sanos (OR 3,98, 95% CI: 2,62-6,02) siendo 33,7% en promedio la prevalencia del CCEB y 12% para los controles. Cabe destacar la importancia del tipo de muestra analizada, ya que la asociación de VPH y CCEB fue significativa cuando el virus fue detectado en biopsias. Sin embargo también arrojó resultados significativos cuando las biopsias de CCEB fueron comparadas con citologías de los controles. Este hecho resulta coherente con los datos que indican que el VPH produce una infección multifocal y la citología exfoliativa puede ser positiva incluso si es tomada de un sitio lejano a la lesión en cuestión (19).

En Argentina, según los datos aportados por el ministerio de Salud de la Nación (Res 563/2011) la prevalencia de infección por VPH global (cervical) fue del 16,6% y los genotipos asociados a cáncer de cuello de útero fueron el VPH 16 (4%) seguido por VPH 35 (2,2%) y VPH 18 (1,9%) (102). Sin embargo no existen datos epidemiológicos de la infección del virus a nivel bucal.

Dentro de los trabajos realizados en la ciudad de Córdoba, en 2006 Benítez y col. estudiaron las citologías exfoliativas y las biopsias mediante técnica PCR de un grupo de pacientes con lesiones premalignas y malignas bucales con sospecha clínica de infección por VPH (n=22) y un grupo de voluntarios con mucosa bucal clínicamente sana como grupo control (n=23). Hallaron que nueve de 22 (41%) de las biopsias del grupo de estudio fueron VPH positivas, mientras que las citologías exfoliativas del mismo grupo fueron 95 a 100% positivas y los genotipos predominantes fueron 16 y 18. En los controles sólo el 9% fue VPH positivo en las citologías (74). Por otro lado, en un estudio caso-control realizado también en la ciudad de Córdoba, Venezuela y col (2013), analizaron biopsias de 4 grupos: 1- pacientes con CCEB (n=16), 2- con lesiones potencialmente malignas (n=29) 3- con lesiones benignas (n=9) y 4- en un grupo control sano (n=30), realizando técnica PCR. Obtuvieron los siguientes resultados: 56% de positividad para VPH en pacientes con neoplasias malignas, donde la localización más

frecuente fue la lengua (4/9), 38% de las lesiones potencialmente malignas y 88% de las benignas y ningún caso de los controles sanos (n=30) fue positivo. Los genotipos más frecuentes fueron 16 y 6 y en los pacientes con CCEB, se encontró una fuerte asociación del VPH a factores como edad, consumo de tabaco y alcohol. Sin embargo observaron que el porcentaje de VPH de alto riesgo aumentaba con la “severidad del carcinoma”, por lo que sugieren su posible rol en el proceso de malignidad (75).

Fuster y col. (2014) en un trabajo diseñado para evaluar el estado periodontal en mujeres no menopáusicas entre 18 y 50 años de edad VPH positivas a nivel ginecológico. Se detectó un 30% de pacientes positivas en borde de lengua y entre el 17% y el 13% en diferentes sectores de la encía; siendo el 67% VPH 16. No encontraron asociación entre la infección y la enfermedad periodontal (76)

HPV y carcinogénesis bucal

Los genotipos definidos por la OMS como de alto riesgo para el cáncer son: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59, los genotipos reconocidos como posibles causantes de cáncer: 68 y 73. Los de bajo riesgo son los subtipos mucosos: 6,11, 42, 43 y 44.

En el caso de los VPH de alto riesgo que causan neoplasia las proteínas virales E6 y E7, expresan diferencias funcionales entre las E6 y E7 de los VPH de bajo riesgo (77).

La proliferación celular mediada por E6 y E7 de las células basales y parabasales facilita la expansión de la lesión lo que es en parte asociado a funciones específicas de estas proteínas. Las mismas forman complejos con reguladores del ciclo vital celular, dando como resultado una producción celular descontrolada que explica la habilidad oncogénica de este tipo de virus (7). Normalmente, estas oncoproteínas están reguladas por genes inhibidores E2 y E1, las cuales pueden alterarse con la integración del virus y dejar liberadas a E6 y E7. La proteína E6, posee una variedad de propiedades biológicas importantes, tiene la habilidad de aumentar la actividad telomerasa y mantener la integridad del telómero durante repetidas divisiones celulares, pero su acción más notable es la fuerte unión que establece con p53, promoviendo su degradación y por consiguiente la inestabilidad celular lo cual, entre otras funciones promueve el crecimiento tumoral (78).

La proteína E7 tiene la habilidad de asociarse a la familia de proteínas retinoblastoma (RB) uniéndose y degradando a p105 y p107 que controlan la entrada del ciclo celular en la capa basal, tanto como a p130 que está asociada al ciclo celular en las capas epiteliales parabasales. La unión de esta proteína con RB forma un complejo que resulta 10 veces más fuerte en VPH de alto riesgo que en los de bajo riesgo (1). Se cree que la expresión de los oncogenes E6 y E7 de VPH 16, convierte a los queratinocitos humanos en células inmortales (3, 79). Otra característica perjudicial de la proteína E7 de los VPH de alto riesgo, es su capacidad para favorecer la inestabilidad del genoma del huésped.

Sin embargo es importante recordar que una función clave de las proteínas E6 y E7 en todos los tipos de VPH no es tanto promover la proliferación de células basales sino más bien, la estimulación del ciclo celular en las capas parabasales lo cual permite la amplificación del genoma y el crecimiento tumoral (80).

Otro aspecto a tener en cuenta, es la integración del virus al genoma de la célula huésped. La técnica real time-PCR permite analizar el estatus viral, que puede ser: integrado, episomal, o en forma mixta. Si bien la integración de VPH 16 ha sido hallada en carcinomas de cabeza y cuello (81), en CB ésta no ha sido estudiada en forma sistemática (2).

Utilizando técnica real time-PCR, Petisaro y col, estudiaron el virus en su forma episomal o integrada en mujeres con lesiones pre malignas cervicales. Hallaron que la mayoría de las lesiones pre malignas cervicales VPH 16 positivas, contenían VPH integrado (82, 83). Además éstas pacientes eran 10 años mayores que aquellas que presentaron la forma episomal del virus. Este dato sugiere que quizás por esta capacidad del VPH 16, la integración es un evento temprano para la inducción de la carcinogénesis por el virus, al menos en cuello de útero.

Además de la integración temprana, los VPH de alto riesgo, tienen la habilidad de persistencia. El VPH16 tiene el mayor porcentaje de persistencia de todos los tipos de alto riesgo, y esto podría contribuir a su característica de mayor riesgo para el cáncer. Pierce Cambell y col (2015) en un estudio multicéntrico (Brasil, México y Estados Unidos), estudió la persistencia del VPH 16 en voluntarios hombres con un rango de edad de 18 a 70 años (n= 1626) para conocer la historia natural del virus a nivel genital

y bucal. Realizaron un examen clínico, y se tomaron datos sobre nivel socioeconómico así como de factores de riesgo. De cavidad bucal se tomaron muestras con buches durante 30 segundos, que fueron luego centrifugadas y se aplicó la técnica PCR. Se recolectó una muestra inicial, otra a las 2 semanas y luego cada 6 meses durante 4 años. Terminado el estudio, se pudieron evaluar 23 hombres para la persistencia a largo plazo de VPH a nivel bucal. Los resultados mostraron que 43,5% (n=10) comenzaron el estudio siendo VPH 16 positivos, de los 13 restantes el 56,5% adquirieron la infección durante el estudio y al finalizar el mismo el 56,5% (n=13) se negativizaron. De éste último grupo el 77% fueron los de infección reciente y solo 3 con infección inicial o persistente. También observaron que la persistencia estaba asociada a mayor edad. Concluyen que es más común que la infección por VPH 16 sea persistente en cavidad bucal, en relación a aquellas infecciones recientemente adquiridas; y que esto podría un factor colaborador de la carcinogénesis (84).

Según los datos expuestos se nos generó la necesidad de conocer la realidad epidemiológica de nuestro medio, sobre cuán prevalente es la infección por VPH en la cavidad bucal, cuáles los genotipos circulantes, así como determinar su asociación a lesiones bucales y a factores de riesgo para el cáncer bucal; datos que hasta la actualidad se desconocían. Además nos planteamos el interrogante: si un paciente es VPH positivo en el tejido de una lesión, lo es en otros sitios de la boca o en saliva. En el caso de las muestras de saliva y a pesar de requerir una técnica no invasiva para su obtención, no ha sido estudiada en profundidad y se desconoce la importancia de detectar VPH en saliva de pacientes sanos o con CB.

HPV e iNOS

El óxido nítrico (NO), una de las diez moléculas más pequeñas en la naturaleza, está compuesta por un átomo de nitrógeno y uno de oxígeno, dejando un electrón impar, lo que lo convierte en un radical libre altamente reactivo. A pesar de su tamaño NOS está involucrado en un amplio número de acciones biológicas. Su reacción con otras moléculas, como un superóxido, lo convierte en un metabolito tóxico, el peroxinitrato (85).

NO es sintetizado por la amino-1 arginina en enzima óxido nítrico sintetasa (NOS). Existen al menos 3 NOS isoenzimas, dos de ella son también llamadas constitutivas

porque se expresan continuamente en las células. La tipo 1 o nNOS, presente en tejido neural y la tipo 3: isoenzima endotelial celular llamada eNOS. Estas enzimas en la membrana celular, contrastan con la isoenzima inducible calcio-independiente llamada iNOS o tipo 2 o isoenzimasintetaza inducible. La iNOS es responsable de la liberación de varias citoquinas incluyendo interleuquina-1, interferón y factor de necrosis tumoral- α .

La expresión y actividad de iNOS y p53 ha sido estudiada por Brennan PA y col (2000) en displasia epitelial leve, moderada y severa y observaron que tanto la intensidad y distribución de iNOS como p53 aumentaba significativamente en displasias severas y estaba ausente en controles sanos (85). También, Morelatto y col. (2006) lo estudiaron en CB y en la mucosa aparentemente sana de los bordes del carcinoma, la cual es considerada una mucosa pre-cancerosa. Hallaron presencia positiva de iNOS en el epitelio de la lesión que resultó estadísticamente significativo ($p=0,002$) OR=40 (IC 95%: 1.9 - 845.4) y también en el epitelio de la mucosa circundante: $p= 0.06$, O R= 11 (IC 95%: 1-117), en comparación con controles. Esto revela que puede ser un marcador de inmunohistoquímica importante asociado a cambios epiteliales premalignos o cancerización de campo existente en estos pacientes (86).

El óxido nítrico (NO) también ha sido estudiado como un importante mediador de la inhibición intracelular de algunos virus como el Herpes-virus (HSV1) y el virus Epstein Barr (EBV), entre otros (87). De Andrea M y col (2006), realizaron un estudio in vitro para determinar si NO estaba relacionado a la patogénesis del VPH, utilizando queratinocitos epidérmicos normales y células inmortalizadas no espontáneamente, comparándolas con un grupo de células control, y las combinó con proteínas E6 y E7 de VPH16. Para confirmar que la inducción de iNOS era funcionalmente significativa midió los niveles de NO₂/NO₃ que es el producto final de NO in vivo. Observó que la cantidad de nitritos y nitratos producidos por E6 y E7 fue superior que en las células controles y concluye que estas proteínas son capaces de aumentar la producción de nitritos y nitratos como resultado de la activación de iNOS (88). Lo descrito nos generó la inquietud de determinar actividad de iNOS por inmunohistoquímica en las muestras VPH positivas y negativas.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la presencia VPH en la cavidad bucal de pacientes con cáncer bucal y relacionar con factores de riesgo.

Objetivos Específicos:

- 1- Estudiar la presencia VPH en la cavidad bucal, en pacientes con carcinomas a células escamosas y carcinomas verrugosos.
- 2- Estudiar la presencia del virus en la lesión, en contra-lateral sano y en saliva.
- 3- Correlacionar la presencia de VPH con otros factores de riesgo para el cáncer bucal.
- 4- Determinar la prevalencia de VPH en la cavidad bucal de la población adulta de la ciudad de Córdoba.

PACIENTES Y MÉTODO

El presente trabajo fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación en Salud (CIEIS), 06 de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba. Los individuos fueron informados de los objetivos del mismo y antes de ser incluidos firmaron el consentimiento informado.

PARA LOS OBJETIVOS 1, 2 Y 3:

Se realizó un estudio de tipo caso-control. Se incluyeron pacientes que concurrieron al Servicio de Estomatología de la Facultad de Odontología Universidad Nacional de Córdoba.

Se conformaron tres grupos con los siguientes criterios de inclusión:

-Grupo carcinoma (GC): 72 pacientes de ambos sexos, con diagnóstico clínico e histopatológico de Carcinoma a células escamosas bucal (CCEB) o carcinoma verrugoso (CV).

-Grupo no carcinoma (GNC): pacientes de ambos sexos (n=41), con lesiones no neoplásicas, no sugestivas de infección por el VPH que requerían de la cirugía para su diagnóstico o tratamiento, tales como: tumores benignos o hiperplásicos simples y desórdenes potencialmente malignos que no presentaran displasia.

-Grupo control voluntarios sanos (GCVS): El grupo control lo conformaron los 401 voluntarios del estudio epidemiológico realizado en la ciudad de Córdoba (objetivo 4). Se seleccionaron 72 voluntarios apareados por sexo y edad con el GC, que no presentaban lesiones bucales al momento de la inspección. El resto de los voluntarios (329) manifestaron alguna lesión, la mayoría asociada a trauma.

Se excluyeron embarazadas y menores de 18 años.

Luego de la firma del consentimiento informado, se confeccionó una historia clínica, donde se consignaron los siguientes datos:

***Consumo de tabaco:** se interrogó sobre el tipo y la cantidad de tabaco consumida durante su vida. Se consideraron fumadores a los que consumieron más de 100 mil cigarrillos (89).

***Consumo de alcohol:** se interrogó sobre el tipo y la cantidad de bebidas alcohólicas

consumidas durante su vida. Se consideraron consumidores aquellos que bebían en forma regular más de 30g/día. Se consideraron no bebedores a los ocasionales (90, 91).

***Presencia de trauma:** se consideró de riesgo cuando se comprobó la existencia de trauma local crónico, dentario, protético o roce asociado a hábitos para-funcionales en relación directa a la lesión (22).

***Consumo de mate:** Se interrogó sobre cantidad de mates consumidos en el día, cantidad de agua en mate calculada en litros por día y se registró la temperatura estimada. Se consideró bebedores de mate a aquellos que consumían mate caliente o más de 500cc con agua tibia. No se consideró el hábito cuando eran bebedores de mate en forma ocasional.

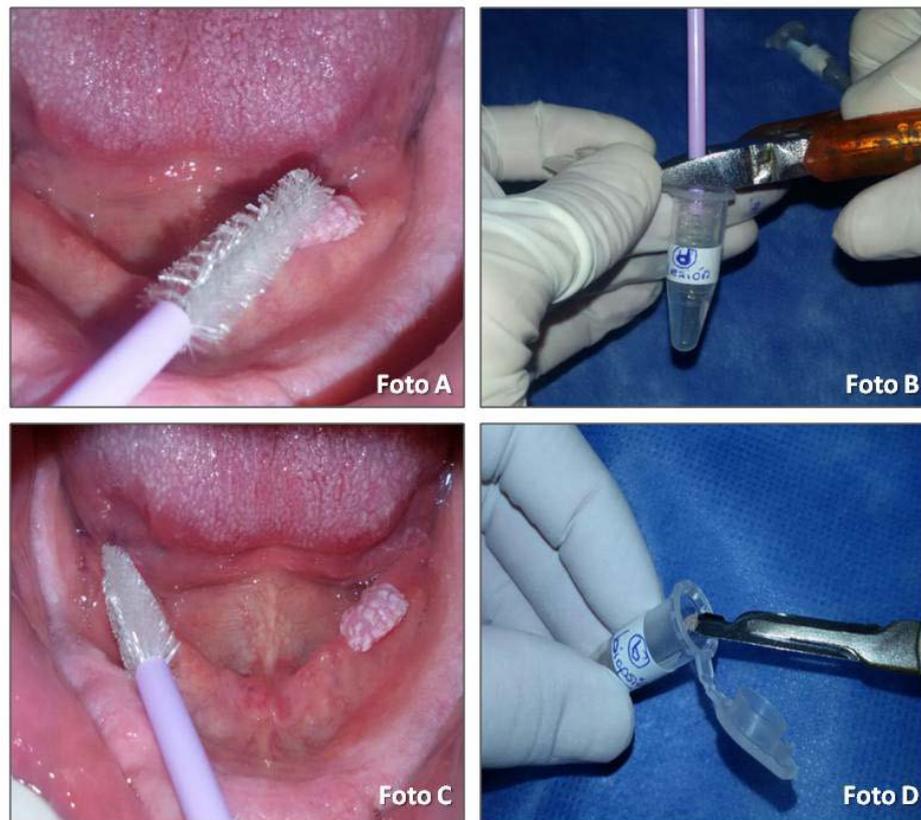
Recolección de las muestras:

Se obtuvieron cuatro muestras de cada paciente perteneciente al GC y al GNC

- a- saliva sin estimular, en tubo tipo eppendorf y conservada en freezer (-80°C).
- b- raspado de la lesión mediante citobrush (**CL**), la muestra se colocó en tubo cónico estéril con 2-5 ml con solución buffer fosfato (PBS) con antibiótico y antimicótico, y se conservó en freezer a 4°C. (Foto A y B)
- c- raspado del contralateral sano a la lesión mediante citobrush (**CS**) (Foto C)
- d- biopsia de lesión: se realizó biopsia convencional con bisturí frío, con fines diagnósticos. La muestra fue fraccionada en dos partes: 1-para estudio anatomopatológico fijada con formol al 10% y 2- un pequeño sector del epitelio fue colocado en fresco en tubo eppendorf y conservado en freezer (-80 °C) para PCR. (Foto D)

En el grupo de voluntarios para el GCVS: se obtuvieron dos muestras

- a- Saliva sin estimular, en tubo tipo eppendorf conservada en freezer (-80 °C).
- b- Muestra del borde posterior de lengua, bilateral, tomada mediante citobrush. se envió en tubo cónico estéril con 2-5 ml de solución buffer fosfato (PBS) con antibiótico y antimicótico; se conservó a 4°C hasta su procesado.



Fotos que ilustran la recolección de muestras: A- citobrush sobre la lesión. B- colocación en tubo eppendorff con medio buffer. C- citobrush de contralateral sano. D- muestra fraccionada para enviar en fresco para técnica PCR.

Estudios histopatológicos

Se realizaron en el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba.

La muestra fue enviada en formol al 10% por ser un fijador que permite preservar el mayor número de estructuras. En el Laboratorio se realizaron los pasos de deshidratación, aclaramiento e infiltración para reemplazar el agua de los tejidos por un medio sólido que permitiera el corte. La superficie epitelial se colocó en la parte más alta del bloque para evitar distorsiones. Se incluyó el tejido en parafina para rodear al tejido de una sustancia firme y obtener secciones delgadas. Se cortó con micrótopo rotatorio con un grosor de 3 a 8 micrones para luego realizar la tinción con Hematoxilina (Solución de Mayer) y Eosina (Solución de Eosina Floxina) según procedimiento. Como medio de montaje se utilizaron resinas sintéticas con el fin de

facilitar el examen de la muestra (92).

Detección de VPH

Se realizó en el Instituto de Virología Dr. José María Vanella. Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Córdoba.

En todas las muestras, para extracción de ADN para técnica PCR, se utilizó el equipo comercial AccuPrep genomic DNA Extraction de Bioneer, con las condiciones que el fabricante describe en su protocolo. Se utilizaron los llamados primers genéricos MY09 y MY11 que permitieron amplificar un fragmento de aproximadamente 450 pares de bases correspondientes a la región L1 del genoma viral, por ser esta una región altamente conservada. La tipificación se realizó mediante el análisis del producto amplificado por el estudio del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción enzimática (RFLP) con la utilización de las siguientes enzimas de restricción: Bam H1, Dde I, Hae III, Hinf I, Pst I, Rsa I, Sau3 AI. El resultado da un patrón en banda característico (93).

Cuando al menos una muestra dio positiva, se consideró pacientes VPH+.

Para el objetivo 4:

La detección de VPH en un grupo de voluntarios, se realizó en el marco de un estudio local de “Relevamiento de parámetros de salud bucal en la población adulta de la ciudad de Córdoba”. Se efectuó un muestreo por conglomerado, polietápico con selección aleatoria de radios censales con probabilidad proporcional al tamaño, bloques, casas y personas; se seleccionó la misma cantidad de personas por radio. Se trabajó con el asesoramiento del Departamento de Estadística y Demografía de la Facultad de Ciencias Económicas y del Programa de Estadísticas Universitarias, Secretaría de Asuntos Académicos UNC. De este modo se obtuvo una muestra de 401 personas adultas, mayores de 18 años, representativa de la población de la ciudad de Córdoba. Este proyecto fue aprobado por el Comité de ética: CIEIS Hospital Córdoba en septiembre de 2013.

El examen bucal y la recolección de muestras de los individuos seleccionados se llevaron a cabo en los servicios odontológicos municipales de la ciudad de Córdoba y

en la Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba.

-Se completó una historia clínica con énfasis en los factores de riesgo más frecuentes de las enfermedades bucales. Los datos se registraron en formularios especialmente diseñados para este proyecto. Se recolectaron los datos de filiación, zona geográfica, edad, sexo y los datos relativos a la salud bucal.

Para la identificación de VPH, se tomaron dos muestras de cada individuo:

- a-saliva sin estimular, en tubo tipo eppendorf estéril y conservada en freezer (-80 °C).
- c- mediante citobrush del borde posterior de lengua en forma bilateral, se envió en tubo cónico estéril con 2-5 ml de solución buffer fosfato (PBS) con antibiótico y antimicótico conservado a 4°C.

El material fue procesado en el Instituto de Virología Dr. José María Vanella. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba de la misma manera descripta en objetivos 1-3. Una submuestra de 72 voluntarios apareados por sexo y edad con el grupo de estudio, constituyeron el GCVS.

RESULTADOS

Se incorporaron al estudio 185 individuos, lo que corresponde a un total de 596 muestras analizadas con técnica PCR. Entre el grupo carcinoma y el grupo no carcinoma se incorporaron ciento trece pacientes (113), de los cuales se obtuvieron cuatro muestras por paciente, como se describió en material y método. Los 72 restantes fueron voluntarios de la población general, seleccionados por muestreo aleatorio según descripción, a quienes se les recolectaron dos muestras por individuo.

El Grupo carcinoma (GC) estuvo conformado por 72 pacientes, con una edad promedio de 64,5 y un rango de 39-85 años; el 54% eran de sexo masculino. En este grupo 63 pacientes (87%), tuvieron diagnóstico de CCEB y 13% de Carcinoma verrugoso (n=9). Treinta y cinco pacientes (49%) presentaron carcinoma en lengua.

En el Grupo no carcinoma (GNC) se incluyeron 41 pacientes con una edad promedio de 57 y un rango de 24-78 años; el 44 % eran de sexo masculino. En este grupo no cáncer, predominaron las lesiones hiperplásicas y traumáticas crónicas en 20 pacientes (49%), 12 (29%) tenían diagnóstico de desórdenes potencialmente malignos (sin displasia) y el resto, 9 pacientes, otras lesiones que se describen en tabla 3. La localización más frecuente de las lesiones fue la mucosa yugal en el 34% de los casos.

En el Grupo control voluntarios sanos (GCVS) se incluyeron 72 individuos apareados por sexo y edad (+/-5 años) con el grupo carcinoma, la edad promedio fue de 63 y un rango de 41-87años. Se seleccionaron individuos que no presentaran patologías bucales al momento de ser inspeccionados (Tabla 1).

Tabla 1: Descripción de los tres grupos estudiados según sexo y edad

Grupo	Sexo		Edad promedio	Total		
		n		(%)	n	(%)
Grupo carcinoma	F	33	(46)	68	72	100
	M	39	(54)	62		
Grupo no carcinoma	F	23	(56)	60	41	100
	M	18	(44)	54		
Grupo control voluntarios sanos	F	33	(44)	66	72	100
	M	39	(54)	61		

DETECCIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

Se detectó VPH en el 42% (n=30) de los pacientes del grupo carcinoma, en el 34% (n=14) del grupo no carcinoma y en el 4% (n=3) de los voluntarios sanos. Estos datos se exponen en la Tabla 2, con la distribución de VPH positivos y negativos según sexo en los tres grupos estudiados.

Tabla 2: Distribución de resultados de PCR para VPH, en los tres grupos estudiados

Grupo	Sexo	n	(%)	Edad promedio	VPH +		VPH -		Total	
					n	(%)	n	(%)	n	(%)
Grupo carcinoma	F	33	(46)	68	15	(45)	18	(55)		
	M	39	(54)	62	15	(38)	24	(62)		
GC Total					30	(42)	42	(58)	72	(100)
Grupo no carcinoma	F	56	(56)	60	8	(35)	15	(65)		
	M	44	(44)	54	6	(33)	12	(67)		
GNC Total					14	(34)	27	(66)	41	(100)
Grupocontrol	F	33	(46)	66	1	(3)	32	(97)		
	M	39	(54)	61	2	(5)	37	(95)		
GCVS Total					3	(4)	69	(96)	72	(100)

En el grupo no carcinoma, el 57% de los VPH+ fueron mujeres. Los pacientes con diagnóstico de desórdenes potencialmente malignos fueron 12 (29%): nueve (9) Lliquen plano y tres (3) leucoplasias simples. De éstos, cuatro líquenes planos (33%) fueron

VPH positivos y ninguna de las leucoplasias. El resto de los pacientes de este grupo (29) presentaron diagnóstico de: nueve (9) proceso inflamatorio inespecífico, seis (6) hiperplasias fibroepiteliales por trauma (pseudopapiloma), tres (3) síndrome de sjögren, tres (3) Quiste mucoide, dos (2) botriomicoma y el resto, épulis, sialometaplasia necrotizante, fibrolipoma, mucosa superficial de boca de fístula, quiste y pénfigo uno (1) de cada uno respectivamente. En la Tabla 3 se describe la distribución en porcentajes de los pacientes VPH positivos y negativos según los diferentes diagnósticos. Para mejor comprensión se dividió en desórdenes potencialmente malignos (DPM) y las otras lesiones como no desórdenes potencialmente malignos (NoDPM).

Tabla 3: Grupo No carcinoma: diagnósticos y porcentajes de VPH positivos y negativos

GNC	Diagnóstico	n	VPH+		VPH-	
			n	(%)	n	(%)
DMP	Liquen	9	4	(33)	5	(42)
	Leucoplasia	3	0	(0)	3	(25)
Total		12	4	(33)	8	(67)
No DMP	Proceso inflamatorio inesp.	9	2	(7)	7	(24)
	Pseudopapiloma	6	6	(21)	0	(0)
	Síndrome de Sjören	3	0	(0)	3	(10)
	Quiste mucoide	3	0	(0)	3	(10)
	Botriomicoma	2	1	(3)	1	(3)
	Quiste	1	0	(0)	1	(3)
	Sialometaplasia necrotizante	1	1	(3)	0	(0)
	Fibrolipoma	1	0	(0)	1	(3)
	Pénfigo	1	0	(0)	1	(3)
Boca de fístula	1	0	(0)	1	(3)	
Total		29	10	(34)	19	(65)
Total		41	14	(34)	27	(66)

En el grupo control voluntarios sanos los tres casos VPH+ fueron dos hombres y una mujer, sin lesiones como correspondió según el criterio de inclusión.

Al analizar y comparar los resultados entre GC y GNC, si bien el grupo carcinoma tuvo un mayor porcentaje de casos VPH positivos, la diferencia no fue estadísticamente significativa, con un OR 1,38 IC (0.63-3.03) p=0.43.

Al comparar el GC con el de voluntarios sanos, se aprecia una diferencia altamente

significativa, con un OR 16,43(IC: 5,10-52,94) $p<0,0001$. Cuando se aplicó el OR buscando asociación entre el GNC y el GCVS el resultado arrojó diferencias significativas OR 11,9 IC (3,42-41,54) $p<0,0001$.

Como se puede apreciar en la Tabla 4, en el grupo carcinoma la presencia de VPH fue similar en ambos sexos y no hubo diferencia significativa entre los pacientes VPH+ con diagnóstico CCEB (43%) o CV (33%).

Tabla 4: Porcentaje de VPH positivos y negativos según diagnóstico en el GC

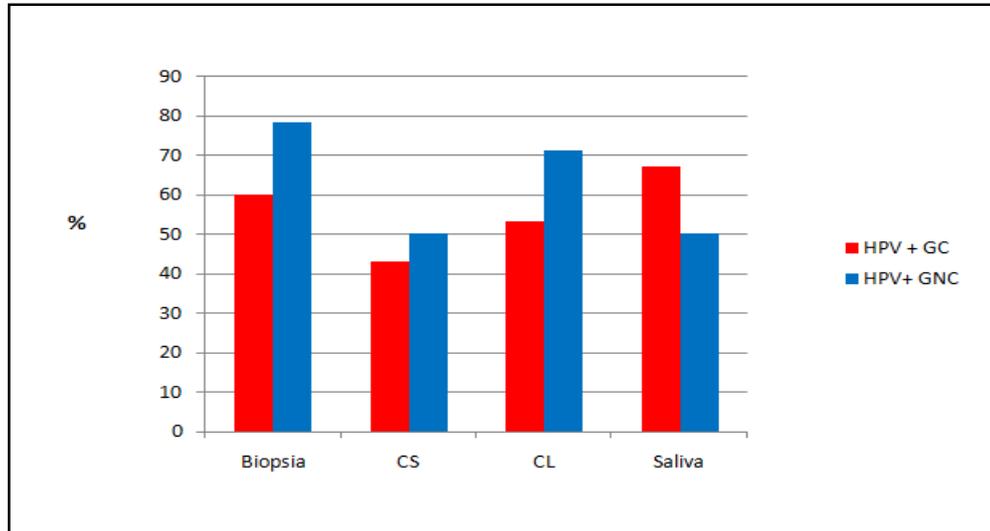
GC	Sexo	VPH+		VPH-		Total
		n	(%)	n	(%)	
CCEB	F	12	(44)	15	(56)	27
	M	15	(42)	21	(58)	36
CV	F	3	(50)	3	(50)	6
	M	0	(0)	3	(100)	3
Total		30	(42)	42	(58)	72

DETECCIÓN DE VPH EN LAS DIFERENTES MUESTRAS

El 80% del GC presentó más de una muestra positiva, predominando la detección de VPH en las de saliva (67%), y en las biopsias en segundo lugar (60%). En el GNC la presencia del VPH en más de una muestra se demostró en el 57%, predominando la detección viral en las biopsias (78%) y en segundo lugar en los cepillados del contralateral sano (71%) (Gráfico 1).

En el grupo carcinoma el 78% de los pacientes con muestras positivas en biopsia, también fueron positivos en saliva; mientras que en el GNC el 55% mostró esta relación.

Grafico1: Distribución de las muestras VPH positivas, según grupo carcinoma (GC) o grupo no carcinoma (GNC)



En el GCVS, donde sólo se tomaron dos muestras de cada individuo (saliva y citobrush), los tres voluntarios dieron positivos en las dos muestras.

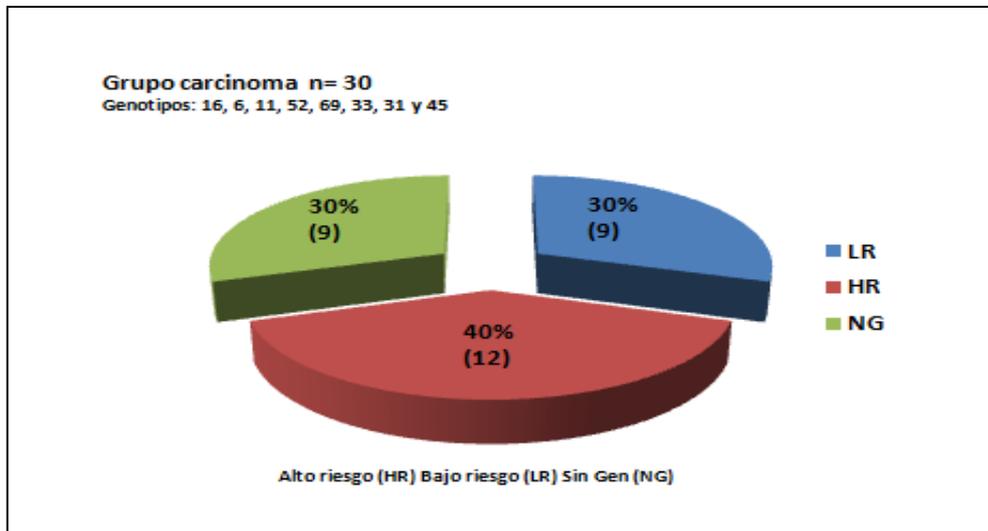
GENOTIPOS DETECTADOS

Los genotipos de VPH detectados fueron 16, 6, 11, 31, 33, 45, 52, 53 y 69, .siendo los más frecuentes 16, 6 y 11. En el GC y GNC hubo muestras donde no se pudo identificar al genotipo.

En el GC el 40% (12) de los pacientes presentaron genotipos de alto riesgo (del inglés high risk: HR): 16, 52, 45, 31, 69 y 33, siendo el 50% de éstos el tipo 16.El resto de los positivos fueron: 30% de bajo riesgo (del inglés low risk: LR): 6 y 11y 30 %sin posibilidad de genotipificar (NG). Estos porcentajes se observan en el Gráfico 2.Dos pacientes de sexo masculino, presentaron genotipos simultáneos: 6/16 y 6/11.En el GNC sólo el 14% (2) fueron de alto riesgo: 16 y 53, y el 57% de bajo riesgo: 6 y 11, el 29% restante no se pudo identificar el gen (Gráfico 3). En este grupo también dos pacientes que presentaron genotipos simultáneos: 6/11 y 16/53. Los dos pacientes VPH de alto riesgo de este grupo, fueron positivos en todas sus muestras, una mujer con liquen erosivo de mucosa yugal tercio posterior, y un hombre con una lesión

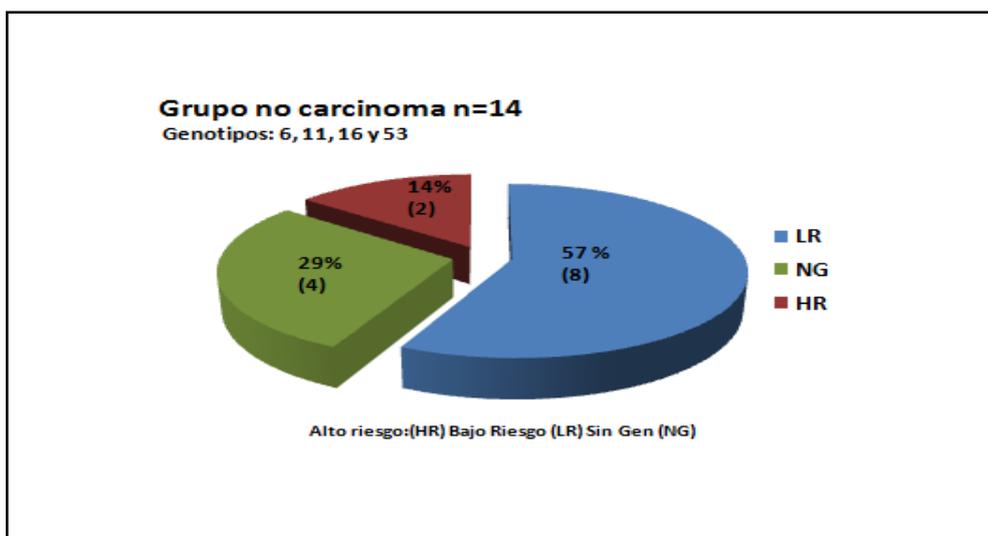
inflamatoria inespecífica de paladar blando. En todos los pacientes (n=3) del GCVS los genotipos fueron de bajo riesgo: 1 en los dos hombres y 8 en la mujer.

Gráfico 2: Distribución de los genotipos en el GC (n=30)



HR: Alto riesgo, **LR:** Bajo riesgo, **NG:** Sin genotipo

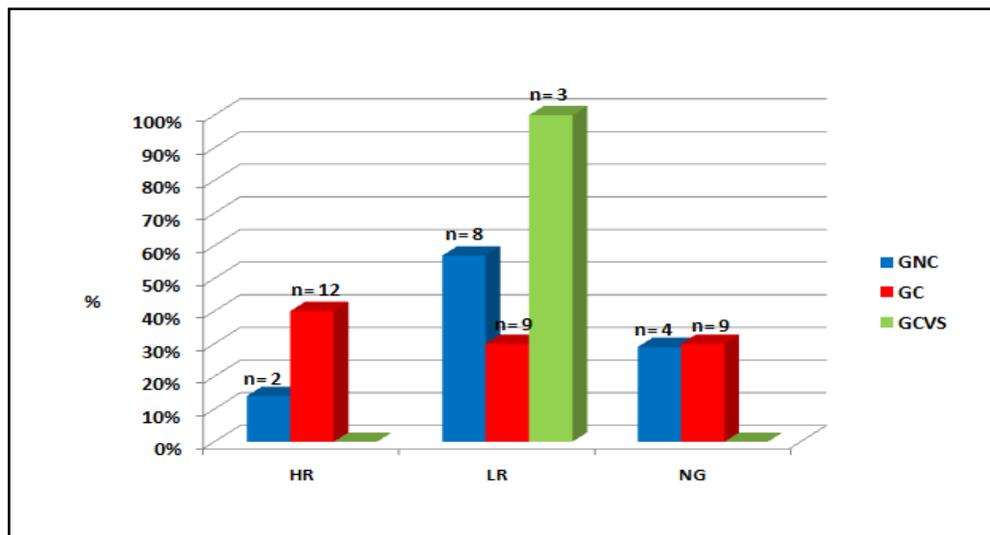
Gráfico 3: Distribución de los genotipos en el GNC (n=14)



HR: Alto riesgo, **LR:** Bajo riesgo, **NG:** Sin genotipo

En el gráfico 4 se puede observar en porcentajes los resultados comparativos entre los genotipos de los tres grupos, según VPH positivos de Alto riesgo, bajo riesgo y sin posibilidad de identificar.

Gráfico 4: Distribución en porcentajes de los genotipos según el riesgo, en los tres grupos estudiados.



HR: Alto riesgo, **LR:** Bajo riesgo, **NG:** Sin genotipo

ANÁLISIS DE FACTORES DE RIESGO

En relación al tabaco y al alcohol considerados factores de riesgo convencionales, no se encontraron como factores de riesgo independientes en los pacientes con cáncer; en todos los casos se presentaron asociados, principalmente a trauma dentario o protético. En el GC el 51% de los pacientes relataron un consumo de más de 100.000 cigarrillos fumados en su vida y el 49% relataron consumir bebidas alcohólicas en forma regular. En este grupo no se hallaron diferencias entre los grupos VPH positivo y negativo, en relación a estos factores. El factor independiente más frecuente fue el trauma crónico en el 21% de los casos. Un solo paciente no presentó factores asociados, y el 99% restante

presentó al menos un factor de riesgo.

La tabla 5 muestra las diferentes combinaciones de los factores de riesgo tabaco, alcohol, trauma dentario o protético e infección por VPH en los tres grupos, según número de casos.

Tabla 5: Distribución de los factores de riesgo en los tres grupos estudiados (n)

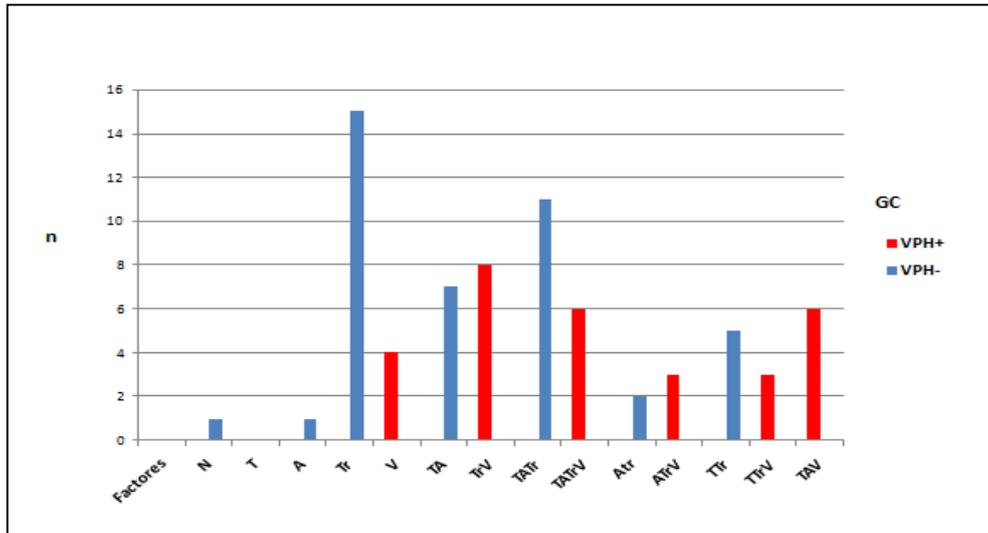
Factores	GNC	GC	GCVS
N	6	1	18
T	1	0	7
A	1	1	15
Tr	10	15	10
V	0	4	1
TrV	6	8	0
TA	1	7	10
TATr	1	11	4
Atr	3	2	2
TTr	4	5	3
TATrV	8	18	2
TOTAL	41	72	72

T= tabaco A= alcohol Tr= trauma V=virus N= ningún factor

Al analizar los factores de riesgo emergentes, como podemos observar en la tabla anterior (4), cuatro pacientes (6%) del grupo carcinoma presentaron VPH de alto riesgo (Genotipos: 69, 33, 16 y 45) como único factor asociado y tres de éstos fueron mujeres, 2 con lesiones localizadas en borde de lengua y una en pilar anterior. El VPH se asoció al consumo de tabaco y de alcohol y al traumatismo crónico en un 36% (n= 26) de los pacientes; sin embargo, la relación virus-trauma se presentó en 11% de los pacientes (n=8) de los cuales el 75% (6) eran mujeres y en lengua. El consumo de mate no se pudo registrar en todos los pacientes de este grupo, pero lo observamos siempre asociado a otros factores.

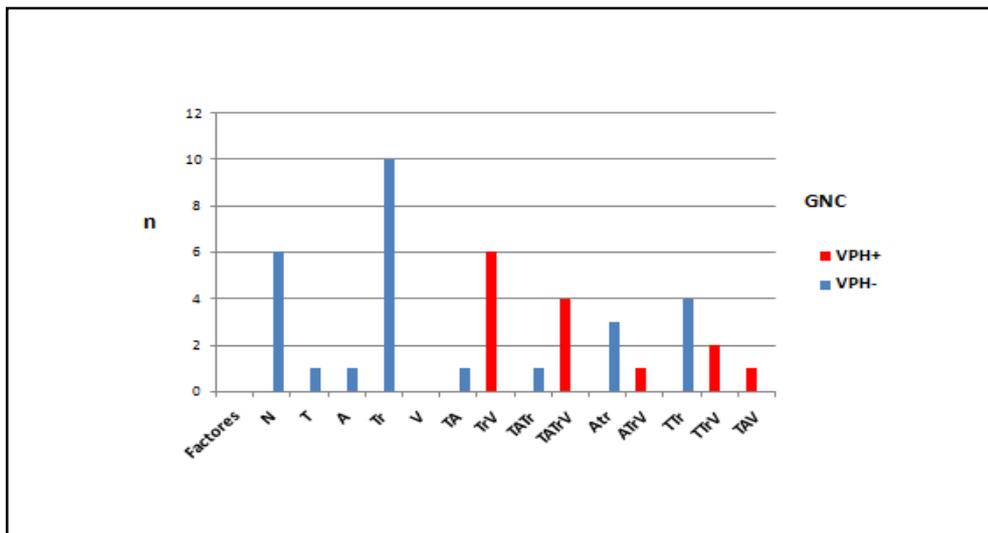
En el siguiente gráfico podemos observar la distribución en número de factores del GC según los pacientes fueran VPH positivos o negativos (Gráfico 5).

Gráfico 5: Asociación de factores del GC según sean VPH positivos o negativos



Del grupo no carcinoma, seis pacientes (15%) no presentaron factores de riesgo, pero en el resto, se encontró asociación a otros factores, siendo el trauma el más frecuente (76%), seguido por el tabaco 32% y por el alcohol en el 29%. La relación virus-trauma fue evidente en 15% de los casos y solo uno fue en lengua. En todos los casos el virus se presentó siempre asociado a otros factores. El gráfico 10 muestra en números la presencia de factores de riesgo del GNC según los pacientes sean VPH positivos o negativos (Gráfico 6)

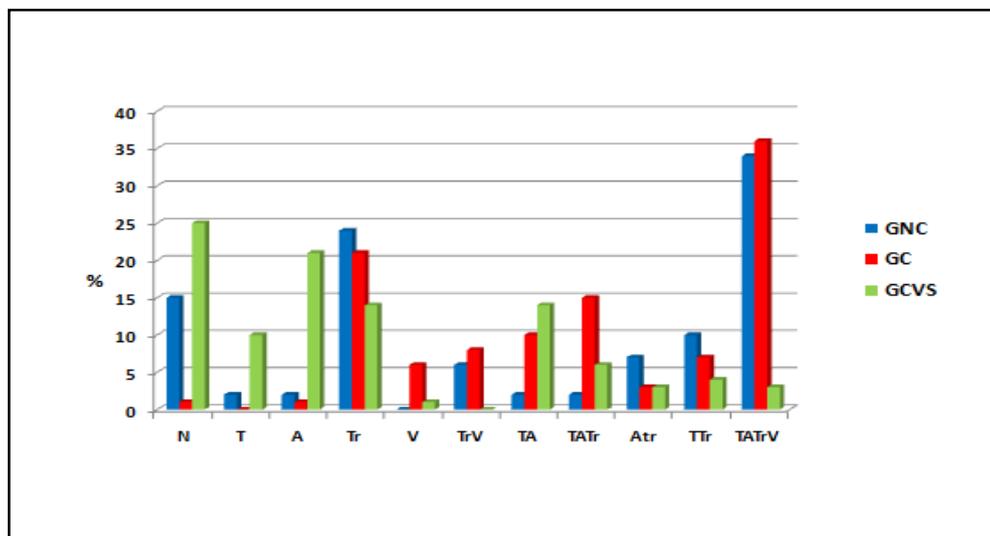
Gráfico 6: Asociación de factores en el GNC según VPH positivos o negativos



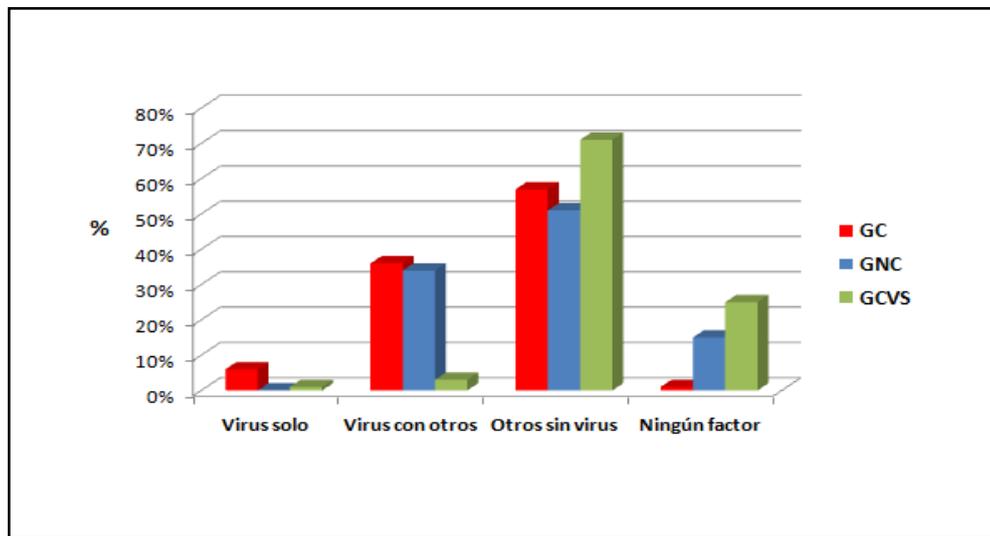
En el GCVS, el 25% (18) no presentó factores de riesgo y el virus como único factor solo en uno de los tres individuos VPH positivos, no habiendo asociación trauma-virus en forma independiente. El 33% tomaba alcohol y 15% presentaba asociación tabaco-alcohol. El 71% de este grupo consumía mate.

Considerando las diferentes asociaciones de factores de riesgo presentadas en la tabla 4, el gráfico 11 nos muestra los porcentajes en los tres grupos (Gráfico 7)

Gráfico 7: Distribución en porcentajes de los factores asociados en los tres grupos GC, GNC y GCVS



Cuando consideramos solo la asociación del virus a otros factores o la presencia de éstos sin el virus en los tres grupos, observamos que en el grupo cáncer, el virus como único factor, se presentó en un 6% y relacionado a otros factores en un 36%. En el grupo lesiones benignas, no se encontró el virus en forma independiente y en un 34% estuvo relacionado a otros factores, es decir muy similar al GC. En el grupo de voluntarios sanos, la mayoría se relacionó a otros factores (Gráfico 8).

Gráfico 8: Asociación del virus a otros factores en los tres grupos

Es decir que el virus del papiloma humano, aparece como un factor de riesgo más, que en algunos casos puede presentarse como factor único, como lo observamos en pacientes con cáncer. Pero generalmente están asociados otros factores como tabaco, alcohol y trauma cuando el paciente presenta algún tipo de lesión, no así en la población clínicamente sana.

DISTRIBUCIÓN DEL VPH SEGÚN LOCALIZACIÓN

Al estudiar la presencia de VPH según la localización se observó que de los pacientes positivos del grupo carcinoma el 60% se localizó en la lengua; mientras que en el GNC el 29% tuvieron esta localización. En la Tabla 6 se expresan los datos en número de casos según las diferentes localizaciones de los GC y GNC según sean VPH positivos o negativos.

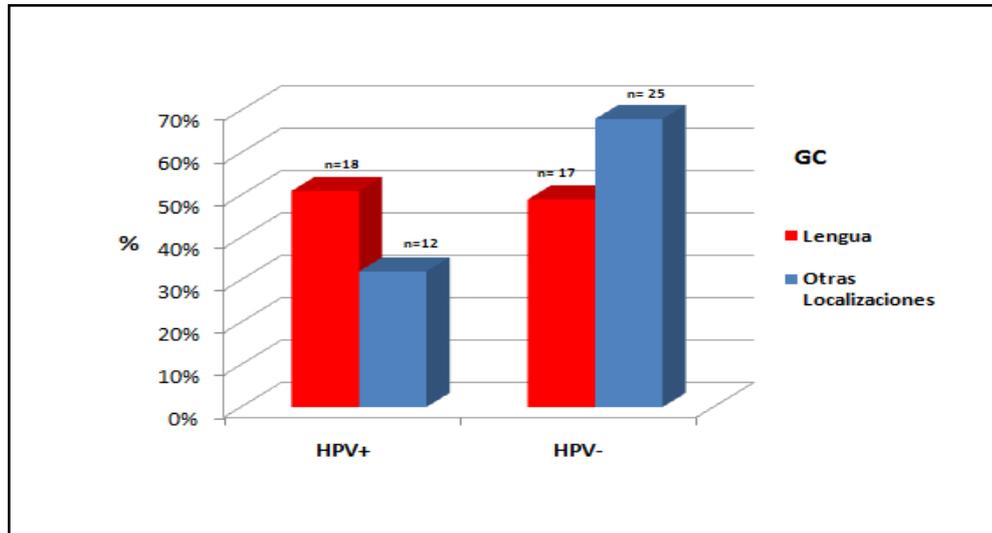
Tabla 6: Distribución de los resultados de PCR según localización en el GC y el GNC (n)

Localización	VPH + GC		VPH - GC		VPH + GNC		VPH - GNC	
	n		n		n		n	
	F	M	F	M	F	M	F	M
Lengua	10	8	11	6	2	2	2	2
Encía/ Reborde	2	2	5	3	0	0	4	2
Piso de boca	0	2	0	6	0	0	0	0
Mucosa yugal	1	0	2	6	4	3	3	4
Paladar	1	2	0	2	2	1	2	0
Semimucosa labial	1	1	0	1	0	0	0	1
Mucosa labial	0	0	0	0	0	0	4	1
Otro	0	0	0	0	0	0	1	1
Total	15	15	18	24	8	6	16	11
TOTAL	30		42		14		27	

En las cuatro localizaciones más frecuentes del grupo carcinoma y considerando cada sitio como el 100% con el fin de eliminarla influencia del número de casos; se observó que 51% de los carcinomas de lengua fueron VPH positivos seguidos por encía, piso de boca y mucosa yugal con un 33, 25 y 13% respectivamente; no se encontró asociación entre localización y VPH en el grupo carcinoma.

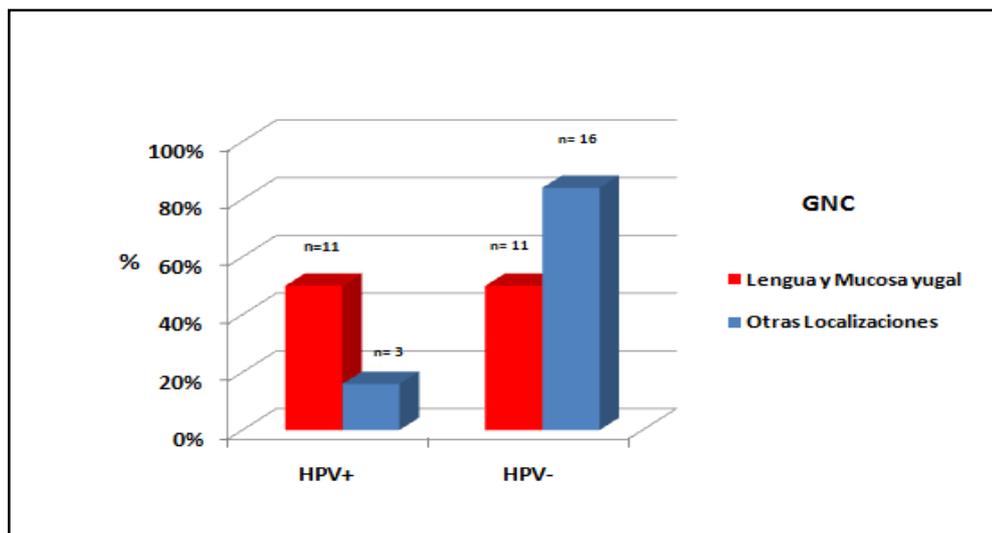
En el gráfico 9 se observa la distribución en porcentajes del grupo carcinoma según la muestra positiva o negativa sea en lengua o en otra localización.

Gráfico 9: Distribución del porcentaje de muestras VPH positivas o negativas según sea en lengua o en otras localizaciones.



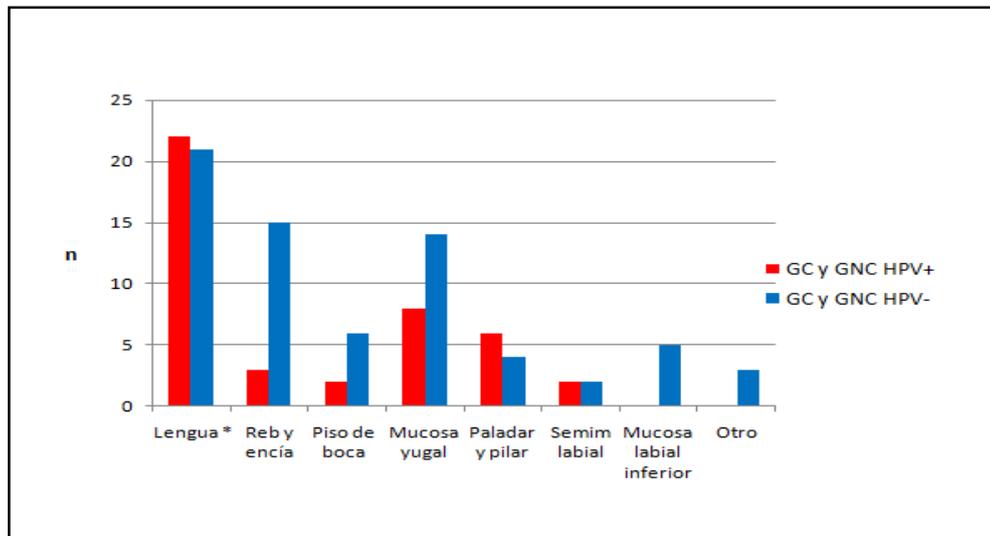
En el grupo no carcinoma la presencia del virus es más frecuente en zonas donde generalmente está presente el trauma dentario o protético como la mucosa yugal y el borde de lengua OR de 5,25 (IC 2,72-10,12) en comparación con otras localizaciones (Gráfico 10)

Gráfico 10: GNC, distribución del porcentaje de muestras VPH positivas o negativas según localización en lengua y mucosa yugal vs otras localizaciones.



Si sumamos los grupos con lesiones, GC y GNC y comparamos los pacientes VPH positivos con los negativos, la presencia del virus sigue siendo más asociada a la lengua en comparación con las otras localizaciones $p=0,04$. (Gráfico 11)

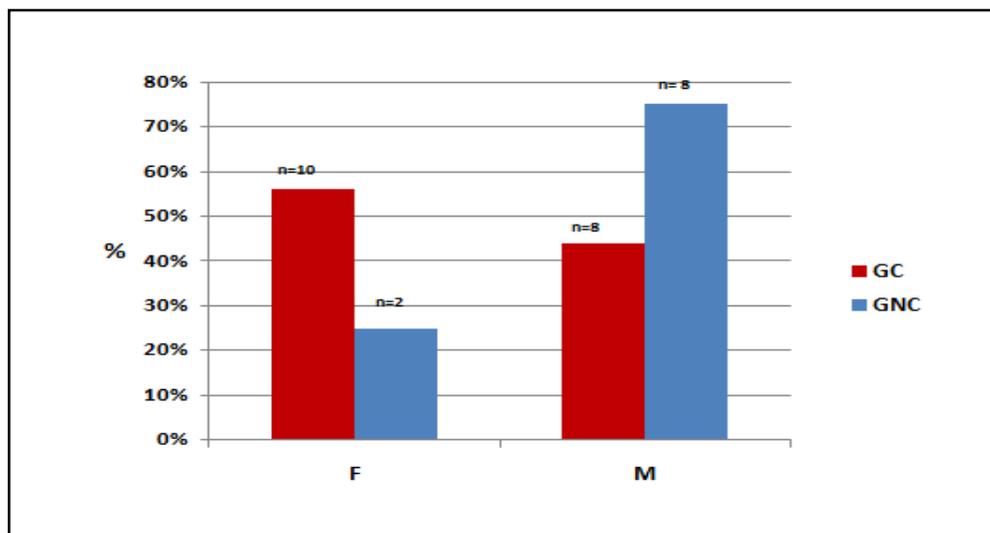
Gráfico 11: Distribución según las diferentes localizaciones de presencia o no de VPH en GC y GNC.



*GC y GLB: asociación VPH +en lengua respecto a otras localizaciones: OR 2,29 (IC 1,05-4,96) $p=0,04$

Si analizamos únicamente los casos VPH positivos de localización en lengua y vemos la distribución según sexo, en el grupo carcinoma el 56% fueron mujeres y en el grupo lesiones benignas el 25% (Gráfico 12).

Gráfico 12: Localización en lengua de VPH + del GC y GNC según sexo



OR 5 (IC 0,94-26,7) $p=0,068$

VPH y EDAD

Al analizar los rangos de edad que presentaron los individuos VPH positivos de los tres grupos, observamos en los grupos carcinoma y no carcinoma, predominaron los rangos medios de 40 a 59 y de 60 a 69, mientras que en la muestra poblacional (n=401) las edades fueron menores, en los rangos 20 a 39 y 40 a 59 años. (Tabla 7). Se tuvo en cuenta a los VPH positivos de todo el grupo poblacional (n=13) para poder comparar rangos de edad, ya que los individuos VPH positivos del GVS era muy reducido (n=3).

Tabla 7: Rango de edad de VPH positivos de GC, GNC y muestra poblacional

Rango	20 - 39	40 - 59	60 - 79	80 - 89	Total
Grupo carcinoma	0	13	14	3	30
Grupo lesiones benignas	0	10	4	0	14
Muestra poblacional	6	6	0	1	13

DETERMINAR LA PREVALENCIA DE VPH EN LA CAVIDAD BUCAL DE LA POBLACIÓN ADULTA DE LA CIUDAD DE CÓRDOBA

En el marco de un proyecto epidemiológico que buscó relevar el estado de salud bucal de la población adulta de la ciudad de Córdoba se estudió la presencia de VPH en muestras de saliva y citobrush bucal.

Se relacionó con los factores de riesgo más frecuentes y con hábitos sexuales.

La población estudiada fue de 401 voluntarios siendo el 62% (n: 248) de sexo femenino y el 38% (n: 153) de sexo masculino, con una edad promedio de 40 años y un rango de 18 a 87 años.

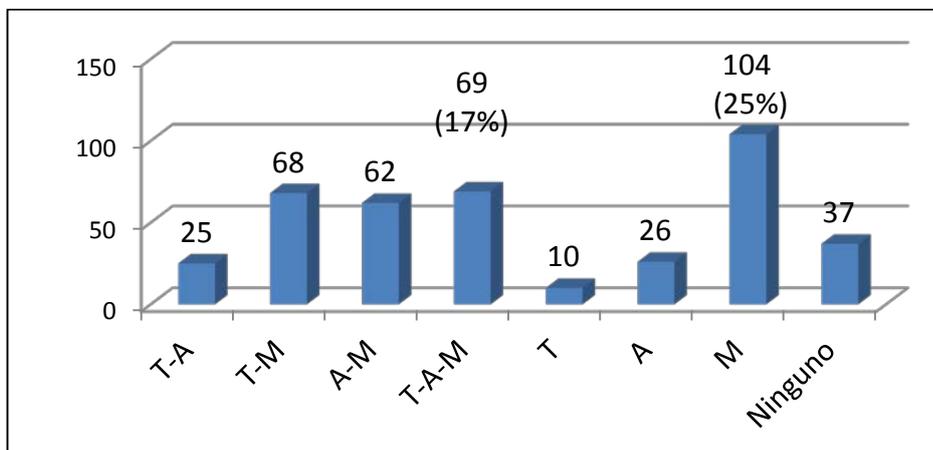
En relación a los hábitos de consumo de tabaco, alcohol y mate en la población: el 42% de los entrevistados fumaba, el 45% manifestó consumir bebidas alcohólicas ya sea de manera habitual u ocasional y el 76% era tomador de mate.

Con respecto al consumo de tabaco la mayoría fumaba cigarrillos rubios con filtro, estableciéndose un promedio de tabaco consumido de 80.000 cigarrillos en la vida con un rango de 312 a 440.000, con 17 años promedio del hábito y un rango de 1 a 48 años.

En relación al consumo de bebidas alcohólicas, el 29% (n: 115) lo hacía en forma habitual, siendo el vino, la cerveza y el fernet las más consumidas en orden de frecuencia. Cuando se calculó el total de g. de alcohol consumido en la vida de cada individuo, se observó que la cantidad promedio era de 320.000 g. y que los valores oscilaban entre 368 y 11.000.000 g.; con un promedio de 16 años de consumo (rango: 1-64 años)

El 76% toma mate, entre 500 y 1000 mL diarios y la mayoría lo bebe caliente. Solamente 37 voluntarios (9%) no manifestaron ningún hábito de consumo y el 35% presentaban un solo hábito: tabaco, alcohol o mate. El 39% de los voluntarios combinaban 2 hábitos y el 17% consumía tabaco, bebidas alcohólicas y tomaba mate (Gráfico 13).

Gráfico 13: Asociación de hábitos Tabaco, Alcohol y Mate



DETECCIÓN DE VPH EN LA POBLACIÓN

El 3,24 % de los individuos de la población estudiada resultó VPH positivo, 7 mujeres y 6 hombres, con una edad promedio de 42 años.

El 77% (10) de estos individuos positivos presentaron alguna lesión bucal al momento de ser examinados, cinco de ellos lesiones combinadas, su mayoría relacionadas a trauma crónico (Tabla 8). En el 85% de los casos (11) el virus se relacionó a otros factores de riesgo; sólo dos (15%) de estos pacientes no presentaron factores asociados.

Tabla 8: Lesiones presentes en los individuos VPH positivos del estudio epidemiológico

Pac	Edad	Sexo	Sin Lesión	Lesiones Malformativas	Lesiones Traumáticas	Lesiones Infecciosas	DPM
1	20	F	x				
2	20	F		Nevo melanocítico			
3	24	M		Manchas raciales	Leucoedema	Candidiasis	
4	24	F		Torus	Melanosis reaccional		
5	27	M		Nevo melanocítico	Mucosa mordisqueada		
6	33	M	x				
7	42	M			Mucosa mordisqueada		
8	46	F		Manchas raciales			Palatitis nicotínica
9	52	M	x				
10	55	F					Leucoplasia
11	55	F			Lesión traumática		
12	56	M			Leucoedema		
13	87	F		Hemangioma	Eritema		

En relación a hábitos sexuales, del total de voluntarios VPH positivos (13) el 38% (5) relató haber practicado sexo oral; mientras que de los VPH negativos el 50%. En la Tabla 9 se comparan los VPH positivos con negativos según el número de parejas sexuales divididos en cinco grupos, de 0 a 11 o más parejas.

Tabla 9: Comparativo del número de parejas sexuales en la población VPH positivos y negativos según porcentajes.

Parejas	VPH +		VPH-	
	n	(%)	n	(%)
0	1	(8)	16	(8)
1 a 3	8	(62)	250	(64)
4 a 6	2	(31)	53	(14)
7 a 10	1	(8)	18	(5)
11 o mas	1	(8)	22	(6)

*OR de 2,81 (IC: 0,88-9,05) p= 0,08.

Se puede observar que tanto en los voluntarios VPH positivos, como negativos, predominan los que tuvieron menos de 3 parejas, no habiendo diferencias significativas, con un OR de 2,81 (IC: 0,88-9,05) p= 0,08.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, el 42% de los pacientes con CB fue positivo para VPH. Este resultado es similar al descrito en trabajos realizados en nuestro medio (74, 75) y está dentro del rango observado si comparamos con los datos publicados a nivel mundial. Los primeros meta-análisis (Miller y Johnstone ,2001), arrojaron porcentajes del 46,5% de VPH positivos en CCEB (73) y Kreimer y col (2005) observaron un 23,5% (94). En la última revisión sistemática del tema Syrjänen S y col. en2011, analizaron los datos publicados entre 1987-2009, con criterios de inclusión muy estrictos seleccionaron 39 trabajos y los resultados obtenidos revelaron un promedio de 33,7% de CCEB VPH positivos (19).

En nuestro trabajo cuando comparamos el grupo carcinoma con el grupo de pacientes que presentaron lesiones no neoplásicas, el porcentaje encontrado en el GC resultó superior, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa con un OR 1,38 IC (0.63-3.03) $p= 0,43$. Este resultado, consideramos que está relacionado a que el GNC presentó lesiones bucales, donde predominaron las hiperplásicas y traumáticas y un 29% correspondieron a desórdenes potencialmente malignos. De éstos últimos, el 33% fue VPH positivo lo cual es un porcentaje similar al observado por otros autores para este tipo de patologías (75). Cabe destacar que todos los pacientes VPH positivos dentro de los DPM fueron líquenes, uno de ellos con genotipo de alto riesgo. Consideramos que el dato que no haya diferencias entre GC y GNC, nos confirma que este grupo de pacientes con lesiones no neoplásicas requiere un seguimiento y control estrictos, principalmente aquellas con DPM.

Por otro lado, al comparar el grupo carcinoma con el grupo de voluntarios sanos, el OR fue de 16,43 $p<0,0001$ lo cual nos revela con este grupo una diferencia notable entre los pacientes con cáncer bucal y la población general clínicamente sana. Este resultado observado en nuestro estudio es el más alto hasta ahora publicado, ya que los OR en la bibliografía varían de 3.7.a 5.9 (19, 73). Probablemente se deba a que lo comparamos con la prevalencia de VPH en la cavidad bucal de la misma población correspondientes al grupo cáncer.

En la literatura, el VPH 16 ha sido identificado como el más asociado a los CCEB, con un rango que va del 20 al 90%. Esta gran variabilidad puede atribuirse al tipo de muestra y al método de diagnóstico utilizado para su detección (95). En nuestro trabajo, a pesar de haber algunos genotipos sin posibilidad de identificar, los resultados demostraron un predominio de VPH de alto riesgo en el grupo carcinoma (40%). En este grupo el 50% resultó VPH 16, mientras que en el GNC sólo dos pacientes (14%) fueron de alto riesgo y el grupo de voluntarios sanos únicamente presentó genotipos de bajo riesgo. Al analizar los pacientes VPH positivos del GNC, una mujer y un hombre presentaron VPH 16, ambos positivos en las cuatro muestras. Además la mujer presentó un genotipo simultáneo también de alto riesgo, y diagnóstico de liquen erosivo. Esto nos indica que a pesar de ser un bajo porcentaje en este grupo, son pacientes de riesgo para cáncer bucal.

Los tipos de muestra recolectadas en los diferentes estudios presentados por la bibliografía, son en su mayoría material de biopsia en tacos de parafina o biopsia de lesiones tomadas en fresco, otros de citología mediante espátula estéril, citobrush o hisopo, y de enjuagues enérgicos para su recolección posterior (19, 96). Sin embargo no encontramos estudios en los cuales se tomen múltiples muestras de un mismo paciente como en este trabajo y muy pocos en donde se analice el virus en saliva. Nosotros observamos que el 80% de los pacientes del grupo carcinoma presentó más de una muestra positiva, mientras que en el GNC el 57%, lo cual re afirma las observaciones sobre una infección multifocal del VPH en boca (97). Las muestras de saliva son económicas y requieren de una técnica no invasiva para su obtención. Se desconoce la importancia de detectar VPH en saliva de pacientes sanos o con CB; la proximidad de éste fluido con las lesiones bucales podría justificar el alto número de muestras positivas ya que arrastraría células epiteliales superficiales. En nuestro estudio obtuvimos una alta positividad en saliva (67%) del GC y el 78% de las muestras de biopsias positivas, también lo fueron en saliva, mientras que en biopsias VPH negativas, el 50% fue positivo en saliva. Zhao y col (2005) analizaron la presencia de VPH 16 en biopsia y saliva de 92 pacientes con carcinoma de cabeza y cuello para comprobar si era un método factible para detección de cáncer y los comparó con muestras de saliva de un grupo control sano (recolectadas de un muestreo comunitario). Sus resultados mostraron 45,6 % de VPH positivos en biopsias de los cuales el 50% también presentó el virus en

saliva y en carcinomas VPH negativos en biopsias, solo el 18% fue positivo en saliva y en los controles sanos 2,8%, lo cual revelaron una diferencia significativa (98). Nuestros resultados en el grupo de voluntarios sanos de la población general que fueron positivos a VPH, todos fueron positivos en la muestra de saliva, a pesar de no presentar lesiones sugestivas de infección por VPH en boca. Nosotros consideramos que la detección de VPH no es sinónimo de “detectar cáncer bucal”, si estamos poniendo en evidencia un factor de riesgo asociado al CCEB.

Por otro lado Chuang y col (2008) analizaron VPH 16 en muestras de saliva de pacientes con CCEB previo y posterior a recibir tratamiento y encontraron que el 34% eran VPH 16 positivos antes del tratamiento y el 40% de estos pacientes desarrollaron recurrencia del tumor. En los análisis de saliva pos tratamiento de los pacientes con recurrencia el 50% Fue VPH 16 +. Por otro lado, tanto los pacientes VPH negativos pre tratamiento como los positivos que no desarrollaron recurrencia del tumor fueron VPH negativos en saliva después del tratamiento. Concluyen que la detección del virus en saliva posterior al tratamiento podría resultar de utilidad como pronóstico de recurrencia en el CCEB (99).

En nuestro estudio, los resultados obtenidos en el grupo carcinoma mostraron que la lengua fue la localización más frecuente y el 51% de estos pacientes fueron VPH positivos. Lee y col. (2010) detectaron un 36% de VPH en carcinomas linguales en comparación con un 4% en controles y concluyen que la lengua podría ser el primer sitio de exposición al virus del tracto aerodigestivo (100). Hay autores que distinguen al cáncer de lengua y al de amígdala como los carcinomas de mayor prevalencia de VPH 16 (2, 19) y otros que atribuyen el incremento en algunos países del CCEB por su relación a la etiología viral en lengua principalmente en mujeres jóvenes (11, 21). Nuestras observaciones estarían de acuerdo con estos autores ya que en el grupo carcinoma existió una asociación entre la localización en borde de lengua y la presencia del virus con un OR de 2,21 (IC: 1,25- 3,92) $p=0,006$. También observamos al comparar los VPH positivos de ambos grupos: carcinoma y con lesiones no neoplásicas, que la localización más asociada a la presencia del virus nuevamente fue la lengua OR 2,34 (IC 1,07-5,12) $p=0,03$. Si analizamos los VPH positivos del GE de localización en lengua, un alto porcentaje de éstos pacientes, tienen también trauma crónico en la zona, lo cual podría haber facilitado la entrada del virus al epitelio (101).

Otro resultado que nos llamó la atención es que el 56% de los carcinomas VPH positivos de lengua, fueron mujeres; mientras en el grupo no carcinoma sólo el 25%. Esto nos podría estar indicando un rol destacado de este factor de riesgo, en relación a los convencionales tabaco y alcohol.

Existe una fuerte asociación entre el consumo de tabaco y alcohol y el CB, especialmente cuando están asociados. En nuestro trabajo en los tres grupos estudiados tabaco y alcohol se hallaron asociados a otros factores y no hubo diferencias entre los VPH positivos y negativos. En el grupo carcinoma 51% de los pacientes relataron consumo de tabaco y 49% de alcohol, datos que son similares a los observados por otros autores (74, 75). Sin embargo, teniendo en cuenta que la bibliografía describe un incremento en la incidencia del CCEB principalmente en personas jóvenes con una escasa exposición a factores como tabaco y alcohol, estudiamos qué asociación existía con algunos factores emergentes (22, 30). En el GC VPH positivos, observamos que sólo en cuatro pacientes (6%) la infección con VPH fue el único factor presente, pero los cuatro pacientes fueron de alto riesgo y el 75% mujeres, dos de localización lingual y una en pilar anterior. El factor más frecuente fue el trauma crónico y la asociación virus-trauma se observó en 8 pacientes de los cuales el 62,5% fue en mujeres y en lengua. Si analizamos la asociación del virus a otros factores (tabaco alcohol y trauma), en este grupo fue de un 36%. Al comparar este resultado con el GNC, observamos que en ningún paciente el VPH se presentó como único factor y la relación virus-trauma en seis de los cuales solo uno fue en lengua en un paciente masculino. Sin embargo la asociación del virus a los otros factores fue similar (34%) lo cual podría estar relacionado a que en ambos grupos los pacientes presentaron lesiones bucales neoplásicas o no. Por el contrario en el grupo de voluntarios sanos debido a que sólo fueron tres voluntarios VPH positivos sin lesión bucal, no resulta conveniente generalizar. En este grupo GVS el 25% no presentaba factores de riesgo.

El consumo de mate como bebida regional que está siendo estudiada como factor emergente para CB (28), no pudo ser estudiado en forma sistemática en este trabajo. En la población general se observó que el 76% tomaba mate y en el 62% de los VPH positivos pero generalmente estuvo asociado a otros factores.

Según los datos aportados por el ministerio de Salud de la Nación (Res 563/2011) la prevalencia de infección por VPH global en Argentina fue del 16,6% y los genotipos

asociados a cáncer cervical fueron el VPH 16 (4%) seguido por VPH 35 (2,2%) y VPH 18 (1,9%) (95, 102). Al analizar los datos obtenidos en el marco del estudio de variables de salud bucal en la población adulta de la ciudad de Córdoba, pudimos observar un bajo porcentaje de individuos VPH positivos a nivel bucal, sólo un 4%, y que los genotipos circulantes fueron de bajo riesgo siendo el 6, 11, 81 y 84 los más frecuentes. Estos datos no los podemos comparar con otras poblaciones ya que en la actualidad no encontramos datos epidemiológicos similares en la bibliografía disponible.

Algunos autores encuentran asociación entre una mayor cantidad de parejas sexuales y la práctica de sexo oral en pacientes con CCEB VPH 16 positivos, principalmente en hombres (103). En nuestro estudio, no encontramos asociación entre hábitos sexuales y la presencia de VPH, ya que el 50% de la población VPH negativa relataba haber practicado sexo oral y solo el 35% de los VPH positivos. Tampoco encontramos una asociación entre la cantidad de parejas sexuales ya que la mayoría expresó haber tenido entre una y tres parejas íntimas. En relación a la edad la mayoría de los VPH positivos estuvo por debajo de los 42 años, etapas de la vida con mayor actividad sexual.

Cuando analizamos los rangos de edad en el grupo poblacional, observamos que hay un predominio de las edades entre 20 – 39 a 40 – 59 años, a diferencia de los grupos carcinoma y grupo no carcinoma, que son de mayor edad. Estos datos podrían interpretarse teniendo en cuenta que en los voluntarios sanos, no se hallaron lesiones compatibles con infección por VPH y el virus podría estar en forma transitoria, además los genotipos fueron de bajo riesgo. Por otro lado, en los pacientes con cáncer la mayor edad, se sumaría la acción de otros factores y al porcentaje de VPH 16, lo que podría asociarse a la persistencia de la infección; observación ya descrita en la bibliografía (77, 84).

Es decir que a la luz de nuestros resultados se aprecia una tendencia a la asociación del virus con otros factores, en pacientes que presentan algún tipo de lesión bucal, neoplásica o no. Por lo tanto desde el punto de vista clínico no se puede afirmar que el virus actúa en forma independiente, pero si resulta importante su asociación a otros factores, principalmente los VPH de alto riesgo y en personas de edad adulta.

Esto nos hace pensar que debemos focalizar la atención al grupo con lesiones no neoplásicas, principalmente cuando son desórdenes potencialmente malignos, que

además de tener factores de riesgo convencionales, son VPH positivos, algunos de alto riesgo y con un rango de edad similar al de los pacientes con cáncer. Probablemente la persistencia del virus crearía la situación propicia para la acción carcinogénica multifactorial. Sin embargo, es un tema que requiere un mayor estudio y análisis (104).

CONCLUSIONES

El virus del papiloma humano en la cavidad bucal se presenta como una infección multifocal y asociada a otros factores como tabaco, alcohol o trauma crónico, es un factor de riesgo para lesiones bucales en especial para carcinomas.

El VPH 16 es el genotipo de alto riesgo más frecuente.

En nuestro medio el VPH es poco prevalente a nivel bucal, los genotipos circulantes son de bajo riesgo y el tipo 11 el más frecuente. Algunos, no han sido descritos en estudios como en el último metanálisis (Syrjänen 2011). Por lo tanto la detección del VPH en pacientes con lesiones bucales, principalmente las potencialmente malignas, revela la importancia del control y el seguimiento de éstos, ya que presentan características similares a los pacientes con carcinomas en relación a edad y otros factores asociados.

La localización en lengua, como sitio de la cavidad bucal altamente expuesto al trauma dentario o protético, puede favorecer el ingreso del virus al epitelio. Además deberíamos profundizar el análisis de las diferentes localizaciones principalmente en lengua en relación al sexo, ya que hemos observado mayor prevalencia en mujeres.

La edad en relación a la persistencia del virus es un tema a estudiar ya que se desconoce el ciclo del VPH en boca y lo observamos en pacientes de edad adulta.

Resultaría interesante estudiar y determinar la implicancia clínica de la presencia del virus en saliva.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- zurHausen H. Papillomavirus infections- a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996; 1288: 55-78.
- 2- Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 2005; 32: 59-66.
- 3- Ha PK, Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15 (4): 188-96.
- 4- Jemal, A. et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61: 69–90.
- 5- Walboomers, J. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999; 189: 12–9.
- 6- L. Alemany, M. Saunier, L. Tinoco, B. Quiro, et al. Large contribution of human papillomavirus in vaginal neoplastic lesions: A worldwide study in 597 samples. *European. J of Cancer* 2014; 15: 270-81.
- 7- Global Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65: 87-108.
- 8- Belardinelli P. Cáncer bucal: asociación entre variables de laboratorio y factores carcinogénicos. Tesis Doctoral. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba 2016.
- 9- Morelato RA, López de Blanc SA. Mortalidad por cáncer en la provincia de Córdoba, República Argentina (período 1975-2000). Estudio comparativo con otras poblaciones. *Medicina y Patología Oral* 2006; 11: 239-43.
- 10- Ramqvist T, Dalianis T. Oropharyngeal cancer epidemic and human papillomavirus. *Emerging Infectious Diseases* 2010; 16: 1671-1677.
- 11- Patel SC, Carpenter R, Tyree S, Couch ME, Weissler M, Hackman T Hayes DN, Shores C, Chera BS. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *J of Clin Oncol* 2011; 29 (11): 1488-1493.
- 12- Attner P, Du J, Nasman A, et al. The role of human papillomavirus in the increased incidence of base of tongue cancer. *Int J Cancer* 2010; 126: 2879-2884.
- 13- Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. *J. Oral Oncol* 2007; 43: 523-34.
- 14- Popovic B, Jekic B, Novakovic I, Lukovic L, Konstantinovic MB, Milasin J.

- Cancer genes alterations and HPV infection in oral squamous cell carcinoma. *Int J. Oral Maxillofac Surg* 2010; 39: 909-915.
- 15- Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 541-550.
- 16- Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray C, Ezzati M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet* 2005; 366: 1784-1793.
- 17- Tachezi R, Klozar J, Rubenstein L. et al. Demographic and risk factors in patient with head and neck tumors. *J Med Virol* 2009; 81: 878-887.
- 18- Lissowska J, Pilarska A, Pilarska P y col. Smoking, alcoholic, diet dentition and sexual practices in the epidemiology of oral cancer in Poland. *Eur J Cancer Prev* 2003; 12: 25-33.
- 19- Syrjänen S, Lodi G, von Bultzingslowen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G, Challacombe S, Ficarra G, et al, Human papillomavirus in carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Diseases* 2011; S1: 58-72.
- 20- Andrews E, Seaman WT, Webster-Cyriaque J. Oropharyngeal carcinoma in non-smokers and non-drinkers: A role for HPV 2009, *Oral Oncology* 45: 486-91.
- 21- Dahlstrom KR; Little JA; Zafereo ME; Lung M; Wei Q; Sturgis EM. Squamous cell carcinoma of head and neck in neversmoker-neverdrinkers: a descriptive epidemiologic study. *Head & Neck* 2008: 75-84.
- 22- Warnakulasuriya S. Causes of oral cancer– an appraisal of controversies *British Dental Journal* 2009; 207: 471–475.
- 23- Winn DM, Blot WJ, McLaughlin JK, et al. Mouthwash use and oral conditions in the risk of oral and pharyngeal cancer 1991, *Cancer Res* 51:3044-7.
- 24- López de Blanc SA, Baruzzi AM. Mouthrinses containing alcohol and oral cáncer. Revision of epidemiological studies. *Braz Oral Res* 2007; 21 (Spec Iss 1): 16-22.
- 25- Gandini S, Negri E, Boffetta P, La Vecchia C, Boyle P. Mouthwash and oral

- cáncer risk- quantitative meta-análisis of epidemiologic studies. *Annals of Agricultura and Enviromental Medicine* 2012; 19 (2): 173-180.
- 26- Golozar A, Fagundes RB, Etemadi A, Schantz MM, Kamangar F, Abnet CC, Dawsey SM. Significant variation in the concentration of carcinogenic pycyclic aromatic hydrocarbons in *yerba mate* samples by brand, batch and processing method. *Environ Sci Technol* 2012; 46 (24): 13488-13493.
- 27- Pintos J, Franco EL, Oliveira BV, Kowalski LP, Curado MP, Dewar R. Mate, Coffe, and Tea consumption and fisk of cancers of the upper aerodigesive tract in Southern Brazil.. *Epidemiology* 1994; 5: 583:90.
- 28- Vera J et al. Cancer and yerba mate consumption: a critical bibliographical review of possible associations. *Pan American Journal of Public* 2008; 320:328.
- 29- Piemonte, ED; Lazos JP; Brunotto M. Relationship between trauma of the oral mucosa, oral potentially malignant disorders and oral cancer *J of Oral Pathology& Medicine* 2010; 39: 513-17.
- 30- Guha N, Boffetta P, Filho VW et al. Oral health and risk of squamous cell carcinomas of head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *Am J of Epidemiol* 2007: 1-14.
- 31- Eisenbrand G, Spiegelhalder B, Preussmann R. Nitrate and nitrite in saliva. *Oncology* 1980; 37: 227-31.
- 32- Tillonen J, Homann N, Rautio M, et al. Role of yeasts in the salivary acetaldehyde production from ethanol among risk groups for ethanol-assiciated oral cavity cancer. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23: 1409-15.
- 33- Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 2006; 124: 823-35.
- 34- Sanjaya PR, Gokul S, GururajPatil B, Raju R. Candida in oral pre-cancer and oral cancer. *Medical Hypotheses* 2011; 77: 1125-1128.
- 35- zurHausen H Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and it causation by specific human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 186: 131-156.
- 36- zurHausen H. The search for infectious causes of human cancers: Where and Why. *Virology* 2009; 392: 1-10.
- 37- zurHausen H. Novel human polyomaviruses – Re-emergence of a well known

- virus family as possible human carcinogens. *Int. J. Cancer* 2008; 123: 247-250.
- 38- Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang DH, Haugen TH, Turek LP. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *Journal of National Cancer Institute* 2004; 96 (6): 449-445.
- 39- Ibieta BR, Lizano M, Frias-Mendivil M, Barrera JL, Carrillo A, Ruiz-Godoy LM, Mohar A. Human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma in a Mexican population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 99: 311-5.
- 40- Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008; 371: 1695-709.
- 41- Vu HL, Sikora AG, Fu S, Kao J. HPV-induced oropharyngeal cancer, immune response and response to therapy. *Cancer Letters* 2010; 288: 149-155.
- 42- Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhonen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 1983; 12: 418-434.
- 43- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Srechenberger PC, Winn WC (h). Diagnóstico de las infecciones producidas por virus, Chlamidias, Rickettsia y microorganismos asociados en Diagnóstico microbiológico. Quinta Ed. Editorial Médica Panamericana. Bs. As, Argentina 1996, (21): 1186.
- 44- Rama CH, Roteli-Martins CM, Derchain SF, Longatto-Filho A, Gontijo RC, Sarian LO, Syrjanen K, Aldrighi JM. Prevalence of genital HPV infection among women screened for cervical cancer. *Rev Saude Publica* 2008; 42: 123-30.
- 45- Clifford GM, Smith JS, Aguado TR, Franceschi S. Comparison of HPV types distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: A meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 89: 101-105.
- 46- zurHausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers- a brief historical account. *Virology* 2009; 6 (5): e20183.
- 47- Bagan JV, Scully C. Recent advances in Oral Oncology 2007: Epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and pronostication. *Oral Oncol* 2008; 44: 103-108.
- 48- Sugiyama M, Bhawal UK, Dohem T, Ono S, Miyauchi M, Ishikawa T.

- Detection of human papillomavirus-16 and HPV-18 DNA in normal, dysplastic, and malignant oral epithelium. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95: 594-600.
- 49- Koyama K, Uobe K, Tanaka A. Highly sensitive detection of HPV-DNA in paraffin sections of human oral carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2007; 36: 18-24.
- 50- De Villers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, ZurHausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17-27.
- 51- Doobar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 2012; 30: 55-70.
- 52- Woolhouse M, Gaunt E. Ecological origins of novel human pathogens. *Crit Rev Microbiol* 2007; 33 (4): 231-42.
- 53- Bravo IG, de Sanjosé S, Gottsching M. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. *Trends in microbiology* 2010; 18 (10): 432-8.
- 54- Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, de Villers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010; 401 (1): 70-9.
- 55- De Villers EM, Gunst K. 2009. Characterization of seven novel human papillomavirus types isolated from cutaneous tissue, but also present in mucosal lesions. *J Gen Virol* 90: 1999-2004.
- 56- Horvath CA, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JP. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an review. *Virol J* 2010; 7:11.
- 57- Ha PK, Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15 (4): 188-96.
- 58- Doobar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *ClinSci (Lond)* 2006; 110 (5): 525-41.
- 59- Joklik WK, Willett HP, Amos BD, Wilfert CM. *Virología clínica en: Microbiología Zinsser*. 20 ed. Editerioal Médica Panamericana, Bs As. Argentina 1995 (Parte V): 1297-98.
- 60- Venezuela F, Kiguen X, Paván J, Cuffini C. Virus Papiloma Humano en *Virología Médica in vivo*. Editores: Adamo MP, Contigiani ML. Córdoba, Argentina 2015;18: 243-622.
- 61- Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol*. 2005; 32: 43-51

- 62- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Virología: Diagnóstico Microbiológico* Bailey & Telford, 11va ed. Editorial Médica Panamericana, Bs As. Argentina 2004; (Parte IV): 832-835.
- 63- Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25(2): 215-22.
- 64- Wilgenburg BJ, Budgeon LR, Lang CM, Griffith JW, Christensen ND. Characterization of immune responses during regression of rabbit oral papillomavirus infections. *Comp Med* 2005; 55 (5): 431-9.
- 65- Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25 (2): 215-22.
- 66- Bouda M, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG, Tsoi A, Danassi-Afentaki D, Foukas P, Kyroudi A, Laskaris G, Herrington CS, Kittas C. "High risk" HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant lesions, but not in normal oral mucosa. *Mod Pathol* 2000; 13 (6): 644-53.
- 67- Romanitan M, Nasman A, Ramqvist T, Dahlstrand H. Human papillomavirus frequency in oral and oropharyngeal cancer in Greece. *Anticancer Res* 2008; 28: 2077-80.
- 68- Hobbs CGL, Sterne JAC, Bailey CGL, Heyderman RS, Birchall MA, Thomas SJ. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol* 2006; 31: 259-66.
- 69- Pickering V, Jordan R, Schmidt B. Elevated salivary endotelin levels in oral cancer patients- A pilot study. *Oral Oncol* 2005; 43: 37-41.
- 70- Esquenazi D, Filbo IB, Da Costa Carvalho MG, Souza de Barros F. The frequency of human papillomavirus findings in normal oral mucosa of healthy people by PCR. *Braz J Otorhinolaryngol* 2010; 76 (1): 78-84.
- 71- Teray M, Hashimoto K, Sata T. High prevalence of human papillomavirus in the normal oral cavity of adults. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14: 201-205.
- 72- Miller CS, White DK. Human papillomavirus expression 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.
- 73- Miller CS, Johnston B. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis, 1982-1977. *Oral Surg Oral Med*

- Oral Pathol 2001; 91 (6): 622-35.
- 74- Furer V, Benitez MB, Funes M, Lanfranchi SE, Modesti NM. Biopsy vs. Superficial scraping: detection of human papillomavirus 6, 11, 16 and 18 in potentially malignant and malignant oral lesions. J Oral Pathol Med 2006; 35: 338-44.
- 75- Venezuela, RF; Talavera, A; Frutos, MC; Kiguen, AX; Monetty, MS; Sollazo, M; Panico, R; Ferreyra de Prato, R; Cuffini, C. Human Papillomavirus (HPV) in Oral cavity Lesions: Comparison with Other Cancer Risk Factors. J of Microbiol Res 2013, 3(6): 228-233.
- 76- Fuster-Rossello L, Ribootta E, Cuffini C, Fuster-Juan M. Human Papilloma virus in oral mucosa and its association with periodontal status of gynecologically infected women. Acta Odontol Latinoam. ISSN 1852-4834. 2014; 27 (2): 82-88.
- 77- Klingelutz AJ, Roman A. Cellular transformation by human papillomaviruses: lessons learned by comparing high-and-low risk viruses. Virology 2012; 424 (2): 77-98.
- 78- Galloway DA, Gewin LS, Myers H, Luo W, Grandori C, Katzenellenbogen RA et al. Regulation of telomerase by human papillomavirus. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2005; 70: 209-15.
- 79- McLaughlin-Drubin ME, Munger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. Virology 2009; 384 (2): 335-44.
- 80- Pim D, Banks L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high risk vs low risk human papillomavirus. APMIS 2010; 118 (6-7): 471-93.
- 81- Koskinen WJ, Chen RW, Leivo L, Makitie A, Back L, Kontio R et al. Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. Int J Cancer, 2003, 107; 401-6.
- 82- Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. J Clin Microbiol 2002, 40: 886-91-
- 83- Carballal G, Oubiña JR. Papilomavirus en: Virología Médica 2da ed. Liberia Editorial El Ateneo, Bs. As. Argentina 1996, (21): 351-52.

- 84- Pierce Campbell CM; Kreimer AR; Lin HY; Fulp W; O'Keefe MT; Ingles DJ; Abrahamsen M; Villa LL; Lazcano Ponce E; Giuliano A. Long-Term persistence of human papillomavirus type 16: the HPV infection in men (HIM) study. *Cancer Prev Res*, 2015, DOI 10.1158/1940-6207
- 85- Brennan PA, Conroy B, Spedding AV. Expression of inducible nitric oxide synthase and p53 in oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral med Oral Pathol Oral radiol Endod* 2000; 90: 624-9.
- 86- Morelato RA. Estudio de Compuestos Nitrogenados. Su relación con el cáncer bucal. Facultad de odontología, U.N.C, Córdoba, Argentina 2007.
- 87- Reiss CS, Komatsu T. Does Nitric Oxide play a critical role in viral infections? *Journal of Virology*, June 1988: 4547-4551.
- 88- De Andrea M, Mondini M, Azzimonti B, Dell'Oeste V, Germano S, Gaudino G, Musso T, Landolfo S, Gariglio M. Alpha-a and beta papillomavirus E6/E7 genes differentially modulate pro-inflammatory gene expression. *Virus Research* 2007; 124: 220-25.
- 89- Biondi K; Belloni S; Velasco M; Robledo G; Gallardo A; Femopase F; et al. Correlation between oral precancer and cancer and tobacco. *J Dent Res* (1998); 77:5.
- 90- Pentenero M, Brocoletti R, Carbone M; Corotto D; Gandolfo S. The prevalence of oral mucosal lesions in adults from the Turin area. *Oral Diseases* (2008) 14, 356-366.
- 91- Caciva R; Belardinelli P; Blanc ML, López de Blanc SA; Alcohol y salud!! Alcohol y salud? Revisión bibliográfica. *Claves de Odontología* (2015); 74: 41-46.
- 92- Métodos Histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). Publicado por el Registro de Patología de los Estados Unidos de América. Washington DC. 2009 (4 a 10): 27-64.
- 93- Villers and col. Techniques of PCR. *Virology*, 2004: 17-27.
- 94- Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005 (14): 467-475.
- 95- Shaw R, Robinson M. The increasing clinical relevance of human

- papillomavirus type 16 (HPV-16) infection in oropharyngeal cancer. *J of Oral and Maxillofac Surg*, 2011; 49: 423-429.
- 96- D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML. Case-Control study of papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007; 356: 1944-56.
- 97- Barzon L, Militello V, Pagni S et al. Distribution of human papillomavirus types in the anogenital tract of females and males. *J Med Virol*, 2010; 82: 1424-1430.
- 98- Zhao M, Rosenbaum E, Lopes Carvalho A, Koch W, Jiang WW, Sidransky D, Califano J. Feasibility of quantitative PCR-based saliva rinse screening of HPV for head and neck cancer. *Int. J. Cancer*, 2005; 117: 605-610.
- 99- Chuang AY, Chuang TC, Chang S, Zhou S, Begum S, Westra WH, Ha PK, Koch WM, Califano JA. Presence of HPV DNA in convalescent salivary rinses is an adverse prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 2008; 30 (2): 1-5
- 100- Lee SY, Cho EC, Baek SJ, Kim WS, Shin DH, Kim SH. Relevance of human papilloma virus (HPV) infection to carcinogenesis of oral tongue cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010; 39 (7): 678-83.
- 101- Pullos AN, Castilho RM, Squarize CH. HPV infection of Head and Neck Region and its Stem Cells. *Journal of Dental Research*, 2015: 1-12.
- 102- Resolución 563/2011. Dirección Nacional de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles (DiNaCEI). Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. Rivadavia 875. 1 piso. Buenos Aires, Argentina.
- 103- Schuartz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madeleine MM, et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papilloma virus infection. *J Natl Cancer Int* 1998; 90 (21): 1626-36.
- 104- Scully C. Oral Squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to cancer about possible sexual transmission. *Oral Oncology* 2002; 38: 227-234.

GLOSARIO

A: Alcohol

ADN: Acido desoxi ribonucleico

CB: Carcinoma bucal

CCEB: Carcinoma a células escamosas bucal

CIE: Clasificación Internacional de Enfermedades

CIEIS: Comité Institucional de Ética en Investigación en Salud

CL: Citobrush de la lesión

CS: Citobrush contralateral sano a la lesión

CV: Carcinoma verrugoso

DPM: Desórdenes potencialmente malignos

E: Early (Temprana)

EBV: Virus Epstein Barr

EGFR: Factores receptores de crecimiento epidérmico

F: Femenino

GC: Grupo carcinoma

GCVS: Grupo control voluntarios sanos

GNC: Grupo no carcinoma

HAP: Hidrocarbano aromático policíclico

HR: High risk (Alto riesgo)

HSV1: Herpes-virus

HTLV-1: Retrovirus humano T-linfotrópico tipo 1

iNOS: inducible nitric oxide synthase (óxido nítrico sintetasa inducible)

L: Late (Tardía)

LCR: Long Control Region (Región larga de control)

LR: Low risk (Bajo riesgo)

M: Masculino

N: Ningún factor

NG: Sin posibilidad de genotipificar

NO: Nitric oxide (Óxido nítrico)

NoDPM: No desórdenes potencialmente malignos

NOS: Nitric oxide synthase (óxido nítrico sintetasa)

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odds Ratio

PBS: Phosphate Buffer Solution (Solución buffer fosfato)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de polimerasa)

RA: Riesgo acumulado en porcentaje a los 74 años

RB: Retinoblastoma

RES: Riesgo de edad estandarizado

T: Tabaco

Tr: Trauma

V: Virus

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

VPH: Virus del papiloma humano

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Usted está invitado a participar en este estudio de investigación y puede decidir si desea participar o no. También se le informa que Ud. se reserva los derechos de interrumpir o abandonar el estudio y/o tratamiento cuando lo desee, sin sufrir penalidades ni pérdida de los beneficios para los cuales estuviese calificado. La siguiente información describe el estudio y su rol como participante. Por favor, tómese su tiempo para decidir lo que va a hacer, lea atentamente y no dude en hacer las preguntas que necesite acerca de la información que se le proporciona. Es importante que sepa que no significará ningún costo extra para Ud. y que recibirá por escrito los resultados obtenidos. Ante cualquier otra duda puede comunicarse directamente con el investigador responsable.

Proyecto: “Prevalencia del virus del papiloma humano (HPV) en pacientes con cáncer bucal. Presencia del virus en saliva. Relación con otros factores de riesgo”. Investigador responsable: María Inés Criscuolo.

El objetivo de este trabajo es estudiar la presencia del virus del papiloma humano (HPV) en la mucosa bucal. Se relacionará con el consumo de tabaco y alcohol. Se estudiará también su presencia en saliva, y las características de las células superficiales, y en caso de ser necesaria la biopsia para arribar a un diagnóstico de certeza, se analizarán algunos marcadores celulares.

Por qué se está haciendo este estudio?

Diferentes trabajos han descripto asociación entre el HPV y el cáncer bucal.

Quiénes no deberán participar en este estudio?

Pacientes que presenten lesiones sugestivas clínicamente de infección por HPV, menores de 18 años.

Qué se me pedirá que haga?

El procedimiento se llevará a cabo de la siguiente manera:

- 1) Se confeccionará una historia clínica y con el objeto de registrar las lesiones se tomarán fotografías.
- 2) Se realizará la recolección de 1 ml de saliva, directamente en tubos plásticos estériles.
- 3) Por raspado superficial con cepillo estéril, se realizará citología de la lesión y de la mucosa sana del lado opuesto a la lesión.
- 4) Se realizará biopsia de lesión para diagnóstico de certeza y se enviará una pequeña parte para estudio específico de detección de HPV.

Dónde se llevará a cabo el procedimiento?

Consultorio Externo de la Cátedra de Clínica Estomatológica B. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba. Haya de la Torre s/n, Ciudad Universitaria, Córdoba. Tel: 0351-4333033 (int164)

Dónde y cómo serán almacenadas y procesadas las muestras para detección de HPV?

Para detección de HPV, las muestras serán almacenadas, procesadas mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) y luego destruidas según procedimientos habituales en el Instituto de Virología J. M. Vanella. Facultad de Ciencias Médicas. Ciudad Universitaria. Córdoba. Tel: 0351-4334022.

Para diagnóstico de certeza las biopsias serán procesadas en el ABO Facultad de Odontología y los marcadores en la Cátedra de Anatomía Patológica de la Universidad de Buenos Aires. Los archivos de los tacos se mantendrán de por vida.

Investigador responsable:

Odontóloga María Inés Criscuolo Cátedra de Estomatología B. Facultad de Odontología. U.N.C. Días Lunes y Jueves de 8 a 13 hs Tel: 0351- 4333033 (int 164) y

Tel: 0351-4262690 y -156011914.

Director Silvia López de Blanc. Días Lun, Mar y Jueves de 8 a 13 hs

Los efectos colaterales o daños posibles serían los de cualquier cirugía menor de boca en caso de realizarse biopsia, a pesar de utilizar elevados estándares de calidad, pueden ocurrir aún sin falta o falla suya o de los profesionales. Entre éstas sangrado, dolor, infección. Pero si existiera algo eventual se le proveerá la atención médica que corresponda en tiempo y forma sin que signifique ningún gasto para Ud. en el Hospital Nacional de Clínicas (Santa Rosa 1200, Te: 0351-4337015/17).

Se cuenta con Seguro de Mala Praxis: Empresa San Cristóbal Seguros Generales.

Póliza número 031101013001/4

Se respetarán las Buenas Prácticas Clínicas de la Organización Panamericana de la Salud y la Declaración de Helsinki, por el investigador y su equipo de trabajo.

Confidencialidad:

Se le informa que los datos obtenidos durante su atención serán confidenciales, y dentro de las leyes y/o regulaciones aplicables, no se harán de conocimiento público, asegurándose su privacidad, amparados por la Ley Nacional de Hábeas Data 25326/2000 (ley de protección de datos personales).

El presente protocolo ha sido evaluado por el Comité Institucional de Ética en Investigación en Salud CIEIS de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba. Coordinador: Dra Silvia López de Blanc, Sub-Coordinador: Dra Alicia Simbrón. Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba. Haya de la Torre SN Pabellón Argentina Ciudad Universitaria, Córdoba. TE: 4333033 interno 164 o 179. Días Lunes, Martes y Jueves de 9 a 13 hs.

La firma de este consentimiento no significa la pérdida de los derechos que legalmente le

corresponden de acuerdo a las leyes vigentes en la República Argentina.

He leído y entendido este consentimiento. He conversado con el odontólogo responsable sobre el propósito del estudio y todas mis preguntas han sido contestadas. Yo acepto participar libre y voluntariamente en este estudio de investigación.

El firmante, Sr /Sra.....

DNI / LE / LC..... de años de edad.

Domicilio.....Tel.....

Córdoba,.....de....., 2.....

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA VOLUNTARIOS PARTICIPANTES EN EL
PROYECTO:

**ESTUDIO DE PARÁMETROS DE SALUD BUCAL EN POBLACIÓN ADULTA DE LA
CIUDAD DE CORDOBA**

Usted está invitado a participar en este estudio de investigación y puede decidir si desea participar o no. La siguiente información describe el estudio y su rol como participante del mismo. Por favor, tómese su tiempo para decidir lo que va a hacer, lea atentamente y no dude en formular las preguntas que considere necesarias acerca de la información que se le proporciona en este documento. El equipo que lleva a cabo esta investigación responderá cada una de ellas.

Diversas patologías de la cavidad bucal afectan no sólo a nivel local, sino además tienen consecuencias en todo el organismo, con un importante impacto social, entre ellas, la caries, la gingivitis-periodontitis (llamada también piorrea), las enfermedades de la mucosa bucal, entre ellas el cáncer, y alteraciones en la mordida. En este estudio, se busca determinar factores que produzcan más riesgo a enfermar y que estén asociados a estas enfermedades. Por esto, se le solicitarán datos para confeccionar su historia clínica y se tomarán muestras de su saliva para la determinación de algunas sustancias presentes en la misma, que indican el nivel de inflamación de su mucosa bucal, la presencia de hongos (*Candida*) o virus (HPV) y/o su predisposición a padecer periodontitis.

¿Por qué se está haciendo este estudio?

El propósito de este estudio es realizar una Investigación Clínica Epidemiológica para conocer problemáticas de salud bucal: caries, la gingivitis-periodontitis (llamada también piorrea), las enfermedades de la mucosa bucal y alteraciones en la mordida en la población de la capital cordobesa, esenciales para planificar políticas de salud, para la educación para la salud de la comunidad y la capacitación profesional, enfocadas especialmente a la prevención y a la asistencia de las necesidades de la población.

Se realizará el diagnóstico, orientación terapéutica y si fuera necesario, usted será derivado al servicio de odontología especializado correspondiente.

¿Quiénes no deberían participar en este estudio?

Las personas menores de 18 años y aquellas personas con: cardiopatías congénitas, endocarditis infecciosa previa, valvulopatías, válvulas cardíacas protésicas o material protético para reparación de válvulas cardíacas, transplantados cardíacos, neutropénicos, pacientes con marcapaso y/o con catéter endovenoso.

¿Qué me pedirán que haga?

En la primera visita se llenará una historia clínica y se registrará el estado de la cavidad bucal en general.

El procedimiento de la toma de muestras se llevará a cabo de la siguiente manera:

- 1) Toma de muestra de saliva, directamente en tubos plásticos calibrados.
- 2) Se tomarán muestras de células de la lesión y de mucosa bucal sana, por hisopado superficial o con un pequeño cepillo estéril.
- 3) Se obtendrá el fluido de la encía con un papel absorbente.

El material obtenido será almacenado hasta las determinaciones en freezer a -18°C y -80°C en el Instituto de Virología J.M. Vallana, Fac. De Ciencias Médicas, UNC Tel: 0351-4334022 y en el Laboratorio de la Cátedra B de Química Biológica, Fac. de Odontología UNC. Tel: 4333033 interno 156. Las muestras quedarán identificadas con un código alfa numérico. Una vez realizadas las determinaciones, las muestras se descartarán previa esterilización (autoclave y/o hipoclorito al 5%), a través de los servicios de residuos biopatógenos.

El presente protocolo ha sido evaluado por el Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud del Adulto. Coordinador DR. IVAN RODRÍGUEZ GÓMEZ, Sub-Coordinador DR. ERNESTO TOLEDO. Av. Patria 656- Hospital Córdoba- TE 0351-4524476. Lunes a Viernes de 8:00 a 13:00 hs.

Versión 3- 27 de Septiembre de 2013

¿Qué efectos adversos podría sufrir si participo en este estudio?

Después del examen bucal ocasionalmente se puede sentir molestias o leve inflamación.

¿A quién debo llamar si tengo preguntas?

*Dra. Silvia López de Blanc o Dra Miriam Grenón o Dr. Mauricio Kremer o Dra. María Laura Irazusta.

A pesar de ser improbable, si hubiere alguna emergencia relacionada con la atención usted podrá dirigirse a la Guardia Central del Hospital Nacional de Clínicas, Santa Rosa 1564, tel 4337014 o al Servicio de Oncohematología del mismo hospital de la ciudad de Córdoba, o dirigirse al Viejo Hospital San Roque. Rosario de Santa Fé 374. (5000) – Córdoba. Tel: 0351-4342437 o al Instituto Municipal, San Martín al 850 o a la Cátedra de Estomatología B o Pericdoncia A u Ortodoncia B: teléfonos 4334274/76-internos 164, 112 y 120. Facultad de Odontología. Ciudad Universitaria.

¿Qué beneficios puedo esperar de mi participación en este estudio?

Ud. tendrá un diagnóstico del estado de su boca, orientación terapéutica y en caso de ser necesario será derivado al centro de salud correspondiente. Ud. podrá participar de una actividad informativa sobre salud bucal.

Responsabilidad:

Los efectos colaterales o los daños que pudieran producirse son los inherentes a cualquier examen bucal. Si existiera una eventual lesión relacionada con la investigación, se le proveerá la atención odontológica-médica que corresponda en tiempo y forma sin que signifique ningún gasto para usted. Los profesionales actuantes poseen seguro de mala praxis.

El presente protocolo ha sido evaluado por el Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud del Adulto. Coordinador DR. IVAN RODRÍGUEZ GOMEZ, Sub-Coordinador DR. ERNESTO TOLEDO. Av. Patria 656- Hospital Córdoba- TE 0351-4524476. de Lunes a Viernes de 8:00 a 13:00 hs.

¿Qué debo hacer si tengo alguna duda acerca de la aparición de un síntoma o una modificación de algún síntoma preexistente?

Puede consultar con su odontólogo-médico de cabecera o con cualquiera de los investigadores del estudio, cuyos datos figuran al final de este protocolo.

¿Quién podrá ver mis registros y saber que yo estoy incluido en el estudio?

Si usted acepta participar en este estudio, sus datos personales serán confidenciales, no serán de conocimiento público (Ley Nacional de Hábeas Data 25326/2000 -ley de protección de datos personales). Si se publicaran los resultados del estudio, la identidad del sujeto se mantendrá confidencial. Sólo tendrán acceso directo a los registros médicos para examinar la información del estudio, los investigadores, su odontólogo-médico, el comité de ética y los inspectores de las agencias regulatorias del gobierno.

¿Se me informará si se descubre nuevo conocimiento durante el curso del estudio?

Se le dará a conocer con tiempo toda información nueva y significativa que pueda afectar su interés de permanecer en el estudio.

El presente protocolo ha sido evaluado por el Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud del Adulto. Coordinador DR. IVAN RODRÍGUEZ GOMEZ, Sub-Coordinador DR. ERNESTO TOLEDO. Av. Patria 656- Hospital Córdoba- TE 0351-4524476. Lunes a Viernes de 8:00 a 13:00 hs.

Versión 3- 27 de Septiembre de 2013

¿Puedo negarme a permanecer en el estudio y pueden pedirme que deje el estudio?

Su participación en este estudio es voluntaria. Usted puede elegir no formar parte del estudio, o puede abandonarlo en cualquier momento sin sufrir penalidades, ni pérdida de los beneficios para los cuales estuviese calificado.

La firma de este consentimiento no significa la pérdida de los derechos que legalmente le corresponden de acuerdo a las leyes vigentes en la República Argentina.

Usted recibirá una copia de este consentimiento firmado.

He leído y entendido este consentimiento. Todas mis preguntas han sido contestadas y yo acepto participar voluntariamente en este estudio

Nombre del paciente

Firma del paciente Fecha

Nombre del testigo

Firma del testigo Fecha

Nombre del investigador o persona por él designada

Firma del investigador o persona por él designada Fecha

*** Datos de los investigadores principales con respectivos horarios de atención en los centros de salud.**

Dra. Miriam Grenón TE: 4334274/76 interno 112. Jueves 8 a 14 hs

Dra. Silvia López de Blanc ... TE: 0351-156633620 las 24hs, o TE: 4334274/76 interno 164. Lunes, martes y jueves: de 8 a 13 hs.

Dra. Paola Belardinelli.....TE: 0351/156878458 las 24hs.

El presente protocolo ha sido evaluado por el Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud del Adulto. Coordinador DR. IVAN RODRÍGUEZ GÓMEZ, Sub-Coordinador DR. ERNESTO TOLEDO. Av. Patria 656- Hospital Córdoba- TE 0351-4524476. Lunes a Viernes de 8:00 a 13:00 hs.

Versión 3- 27 de Septiembre de 2013