

T
1206

ACN SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

124331

124331

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

**INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO COMO
FACTOR DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE CÁNCER
BUCAL E IDENTIFICACIÓN DE LOS PATRONES DE
METILACIÓN EN LA REGIÓN LARGA DE CONTROL (LCR)
DEL VPH-16**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

IRMA GABRIELA ANAYA SAAVEDRA

Co-tutora: Dra. Velia Aydée Ramírez Amador
Co-tutor: Dr. Alejandro Manuel García Carrancá
Asesora: Dra. María Esther Irigoyen Camacho
Asesora: Dra. Claudia María García Cuéllar

México, D.F., septiembre 2007

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco
aprobó la tesis que presentó

Irma Gabriela Anaya Saavedra

El 27 de septiembre del año de 2007

Cotutor: Dra. Velia Aydée Ramírez Amador



Cotutor: Dr. Alejandro Manuel García Carrancá



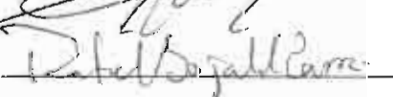
Asesor: Dra. María Esther Josefina Irigoyen Camacho



Asesor: Dra. Claudia María García Cuellar



Sinodal: Dr. Rafael Bojalil Parra



A Andrea
A Gabriel
A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Con profundo agradecimiento a todos los jefes de servicio, enfermeras, residentes, pasantes, laboratoristas, profesores e investigadores, compañeros y amigos, que contribuyeron de manera sustancial a la realización de este trabajo.

Particularmente, mi eterno agradecimiento a quienes dejaron un legado imperecedero, por haber entregado una parte de su existencia tanto a la presente investigación, como a mi

formación profesional:

Dra. Velia Aydée Ramírez Amador

Dra. María Esther Irigoyen Camacho

Dra. Claudia Ma. García Cuellar

Dr. Alejandro García Carranca

Dr. Sergio Ponce de León Rosales

La presente investigación fue realizada gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento con número de referencia 42689, y la beca de Doctorado de Irma Gabriela Anaya Saavedra, con número de registro 117159.

Resumen

Diversos trabajos clínicos y epidemiológicos han demostrado la asociación entre el Virus del Papiloma Humano (VPH) y el cáncer bucal (CB); sin embargo, el carácter oncogénico del virus en mucosa bucal, no ha sido establecido en forma concluyente, como en el cáncer orofaríngeo y ano-genital. Por otro lado, no existen estudios en México que informen acerca de los factores de riesgo involucrados con el desarrollo del CB. Los objetivos del presente estudio fueron analizar la asociación entre el cáncer bucal y la infección por VPH de Alto Riesgo (VPH-AR), y otras variables relevantes como el consumo de tabaco y alcohol, la historia familiar de cáncer y los hábitos sexuales. Un segundo objetivo fue evaluar los patrones de metilación en tres regiones importantes del genoma viral. El estudio fue realizado en un centro de referencia oncológico de la Ciudad de México, incluyó 62 casos de CB y 248 controles pareados por edad y género. Los resultados muestran que los individuos con VPH-AR tienen un riesgo 5.8 veces más alto de presentar cáncer bucal que aquellos sin la infección, independientemente del uso de tabaco y alcohol; asimismo, se confirmó la fuerte asociación entre el consumo de ambos agentes y el CB. Los individuos con antecedentes familiares de cáncer presentaron un riesgo incrementado (3.6 veces) de CB. En los casos, nuestros hallazgos indican que el número de parejas sexuales y el inicio temprano de vida sexual se asocian significativamente con la presencia de VPH-AR ($p=0.033$ y $p=0.019$, respectivamente). Por otro lado, diez de las 12 (83.3%) muestras de pacientes con CB positivo a VPH-16 mostraron hipermetilación de las islas CpG en la regiones estudiadas (L1, LCR 5', enhancer y promotor) en el genoma de VPH-16, lo cual sugiere que el ADN del VPH-16 se encuentra integrado al ADN del huésped en los procesos malignos que afectan la mucosa bucal, de manera similar a lo observado en las lesiones malignas de mucosa anal y genital.

Abstract.

The association between Human Papillomavirus (HPV) and oral cancer (OC) has been reported in several clinical and epidemiological studies; however, in contrast with oropharyngeal and ano-genital malignancies, the oncogenic nature of the virus in oral mucosa is not well established. In Mexico, there is insufficient information about the risk factors associated with the development of oral cancer. The aims of the present study were to analyze the association between oral cancer and High Risk HPV infection (HR-HPV), and other relevant variables such as tobacco and alcohol use, familiar cancer history and sexual behavior. A second objective was to evaluate the methylation patterns of three important regions of the viral genome. The study was performed in an oncological referral center in Mexico City and included 62 OC cases and 248 controls matched by age and gender. The results of the present study showed that individuals with HPV-HR had a 5.8-fold risk for oral cancer compared with those without the infection, independently of tobacco and alcohol use; in addition, the strong association between its consumption and OC was confirmed. Subjects with positive familiar cancer history had increased odds (3.6 times) for OC. In cases, our data indicated that a large number of lifetime sexual partners and an early age at first sexual intercourse were significantly associated with the presence of HR-HPV infection ($p=0.033$ and $p=0.019$, respectively). On the other hand, ten of twelve (83.3%) HPV-16 OC samples showed hypermethylation in the CpG islands of the studied regions (L1, LCR 5', enhancer and promoter) at HPV-16 genome, suggesting that viral ADN are chromosomally integrated in oral malignancies and affects the host cells in a similar manner as in ano-genital malignancies.

ÍNDICE

Abreviaturas	I
Índice de Figuras	II
Índice de Cuadros	III
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Epidemiología del cáncer bucal	1
1.2 Características clínicas del cáncer bucal	2
1.3 Factores de riesgo para cáncer bucal	3
1.3.1 Tabaco	4
1.3.2 Alcohol	5
1.3.3 Factores nutricionales	7
1.3.4 Antecedentes familiares de cáncer	7
1.3.5 Agentes biológicos	8
1.4 Virus del Papiloma Humano	9
1.4.1 Nomenclatura	9
1.4.2 Organización general del genoma	10
1.4.3 Especificidad tisular y ciclo viral	13
1.4.4 Diagnóstico molecular	15
1.4.5 Asociación del VPH con el cáncer bucal	16
1.4.5.1 Género	18
1.4.5.2 Edad	18
1.4.5.3 Tabaco y alcohol	19
1.4.5.4 Localización	20
1.4.5.5 Vías de transmisión	20
1.4.5.6 Asociaciones genéticas	21
1.4.5.7 Pronóstico	22
1.5 Regulación epigenética	23
1.5.1 Metilación	24
1.5.2 Metilación en cáncer bucal	28
1.5.3 Metilación del genoma del VPH	30
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
JUSTIFICACIÓN	32

HIPÓTESIS	33
OBJETIVO GENERAL	33
5.1 Objetivos particulares	34
MATERIAL Y MÉTODOS	34
6.1 Diseño del estudio	34
6.2 Sujetos participantes	34
6.2.1 Casos	34
6.2.2 Controles	35
6.3 Aspectos éticos	36
6.4 Variables	37
6.4.1 Operacionalización de variables	37
6.4.2 Cuestionarios	38
6.5 Análisis estadístico	39
6.5.1 Cálculo del tamaño muestral	39
6.5.2 Análisis de los resultados	40
6.6 Procedimientos clínicos	41
6.7 Procedimientos de laboratorio	42
6.7.1 Extracción y purificación de ADN	42
6.7.2 Amplificación del gen β -globina	44
6.7.3 Amplificación de la región L1 del VPH	44
6.7.4 Reacción de secuenciación	46
6.7.5 Análisis de los patrones de metilación en LCR de VPH-16	47
6.7.5.1 Modificación del ADN y PCR	47
6.7.5.2 Clonación y transformación del ADN-VPH	49
6.7.5.3 Secuenciación del ADN	51
RESULTADOS	53
7.1 Estandarización de los ensayos de laboratorio	53
7.1.1 Curvas de sensibilidad de ADN	53
7.1.2 Curvas de sensibilidad de $MgCl_2$	54
7.2 Amplificación del gen β -globina	55
7.3 Amplificación del ADN-VPH	55
7.4 Factores de riesgo para cáncer bucal	58

7.4.1	Características demográficas y clínicas	58
7.4.2	Consumo de tabaco y alcohol	58
7.4.3	Asociación del VPH con cáncer bucal	59
7.4.4	Análisis multivariado	60
7.4.5	Características clínicas de los casos con y sin VPH	61
7.5	Metilación de VPH-16	63
7.5.1	Metilación en el gen L1 y región 5' de la LCR de VPH-16	66
7.5.2	Metilación del enhancer y el promotor de VPH-16	66
7.6	Asociación entre metilación y características clínicas	67
DISCUSIÓN		78
8.1	Aspectos relacionados al método del estudio	78
8.2	Procedimientos de laboratorio	80
8.3	Factores de riesgo para cáncer bucal	82
8.3.1	Asociación del VPH y cáncer bucal	82
8.3.2	Asociación del tabaco y el alcohol con el cáncer bucal	87
8.3.3	Asociación de la historia familiar de cáncer con el cáncer bucal	88
8.3.4	Características clínico-patológicas y cáncer bucal	90
8.3.5	Hábitos sexuales y cáncer bucal	90
8.4	Patrones de metilación en VPH-16 de CECB	92
8.4.1	Metilación en L1 de VPH-16	92
8.4.2	Metilación en LCR de VPH-16	93
8.4.3	Metilación en el enhancer del VPH-16	94
8.4.4	Metilación en el promotor del VPH-16	95
CONCLUSIONES		97
PERSPECTIVAS		98
REFERENCIAS		102
ANEXOS		116
TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS		123
PUBLICACIONES		125

ABREVIATURAS

AJCC	American Joint Comité on Cancer
BD	Bien diferenciado
CaCU	Cáncer cérvico-uterino
CB	Cáncer bucal
CBO	Cáncer bucal y orofaríngeo
CCC	Cáncer de cabeza y cuello
CECB	Carcinoma epidermoide de la cavidad bucal
ADN	Ácido desoxiribonucleico
DNMTs	ADN metil-transferasas
GST	Genes supresores de tumor
IARC	International Agency of Cancer Research
IC	Intervalo de confianza
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
LCR	Región larga de control
MBDs	Proteínas de unión methyl-CpG
Md	Mediana
MD	Moderadamente diferenciado
ng	nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKD	Digestión con proteinasa K
PS	Parejas sexuales
Q ₁ -Q ₃	Intervalo intercuartilar
Rb	Retinoblastoma
RM	Razón de momios
UB	Unidades de bebida
VPH	Virus del papiloma humano
VPH-AR	Virus del papiloma humano de bajo riesgo
VSA	Vida sexual activa

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Organización genómica del VPH-16	11
Figura 2.	Modelo de transformación maligna del VPH-16 y 18	14
Figura 3.	Metilación del ADN y cáncer	27
Figura 4.	Islas CpGs presentes en las regiones analizadas	48
Figura 5.	Morfología del vector TOPO	50
Figura 6.	Curvas de sensibilidad de ADN	54
Figura 7.	Curvas de sensibilidad de MgCl ₂	54
Figura 8.	Amplificados del gen β -globina	55
Figura 9.	Amplificados de MY09/MY11	56
Figura 10.	Amplificados de GP5+/GP6+	56
Figura 11.	Amplificados de E6-VPH-16	57
Figura 12.	Cromatogramas de secuencias de la región promotora	63
Figura 13.	Metilación de islas CpGs en el VPH-16 en cáncer bucal	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Clasificación epidemiológica de los papilomavirus	10
Cuadro 2.	Condiciones utilizadas en los ensayos de PCR	44
Cuadro 3.	Muestras positivas a VPH para cada oligonucleótido	69
Cuadro 4.	Proporción de tipos virales en las muestras analizadas	70
Cuadro 5.	Distribución de características demográficas en casos y controles	71
Cuadro 6.	Distribución de las características del consumo de tabaco y alcohol en los casos y los controles.....	72
Cuadro 7.	Razones de momios crudas y sus intervalos de confianza al 95% para la infección por VPH en la mucosa bucal.....	73
Cuadro 8.	Razones de momios crudas e intervalos de confianza al 95% para cáncer bucal, de acuerdo a las características clínicas de los grupos.....	74
Cuadro 9.	Razones de momios ajustadas para cáncer bucal obtenidas del modelo de regresión logística condicional.....	75
Cuadro 10.	Hábitos sexuales en pacientes con CECB de acuerdo al VPH de alto riesgo (VPH-AR).....	76
Cuadro 11.	Características demográficas y clínicas de 12 pacientes con cáncer bucal positivo a VPH-16.....	77

INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología del cáncer bucal

A nivel mundial, el cáncer bucal y orofaríngeo (CBO) es un problema importante de salud pública, principalmente en países en vías de desarrollo (Globocan 2006; Parkin y col. 1999). En el año 2000 fueron diagnosticados 484,628 casos de CBO, de los cuales 128,000 fueron defunciones (Globocan 2006).

A nivel mundial, la mayor incidencia de cáncer bucal (CB) en el año 2000 se registró en las Islas Solomon y Papua Nueva Guinea, con una incidencia de 40 casos por 100,000 habitantes (Globocan 2006). La India, España, Portugal, Francia y Hungría son también naciones con tasas altas (13 a 20 por 100,000) de CB (Globocan 2006, Franceschi y col. 2000). En América, Estados Unidos de Norteamérica, Brasil y Puerto Rico, presentan tasas de 8 a 11 casos por 100,000 habitantes; en contraste con El Salvador, Nicaragua y Ecuador, cuyas tasas varían de 0.4 a 1.6 por 100,000. En México, aunque no existen registros que nos permitan determinar la incidencia de CB, según la IARC en el año 2000 la incidencia fue de 2.7 casos por 100,000 habitantes (Globocan 2006).

De acuerdo a un estudio reciente sobre la mortalidad de CBO en México, la proporción de muertes por esta causa permaneció estable durante el periodo 1979-2003 (0.84 a 1.07/100 000 en hombres, y 0.39 a 0.55/100 000 en mujeres). Para ambos géneros, la tasa cruda de mortalidad por CBO fue de 1/100 000 (0.7 y 0.8/100 000 para cáncer bucal y cáncer orofaríngeo, respectivamente). La razón hombre-mujer tampoco mostró cambios en el periodo estudiado, de 2.1:1 en 1979, a 1.9:1 en 2003 (Anaya-Saavedra y col. 2007).

1.2 Características clínicas del cáncer bucal

Más del 90% de las neoplasias malignas de la mucosa bucal corresponden a carcinoma epidermoide (Scully 2000); que puede presentarse como una úlcera, masa o un nódulo indurado, y con cambios de color que generalmente consisten en áreas rojas o blancas y rojas (Zakrzewska 1999; Bsoul y col. 2005).

El CB predomina en el género masculino, sin embargo, la razón hombre-mujer ha aumentado de 6:1 en 1950 a 2:1 en 1997 (CDC, 1998), como resultado del incremento en hábitos relacionados al CB (tabaco y alcohol) en el género femenino durante las últimas tres décadas (Bsoul y col. 2005). La mayor proporción de casos es diagnosticada en la sexta y séptima décadas de la vida; aunque en estudios recientes se ha reportado un incremento alarmante en su incidencia, particularmente en lengua, en menores de 40 años (Bsoul y col. 2005).

Los tres sitios más comunes de presentación del CB son la lengua (30%), el labio (17%) y el piso de la boca (14%) (Shiboski y col. 2000; Ramírez-Amador y col. 1995), aunque se ha reportado un incremento en el número de lesiones que comprometen tejidos gingivales (Barasch y col. 1995) y glándulas salivales (Carvalho y col. 2005; Tarvainen y col. 2004; Morris y col. 2000).

A pesar de los avances en el tratamiento oncológico de los últimos años, la tasa de supervivencia global es del 57% a 5 años (Jemal y col. 2004); si se trata de lesiones localizadas, la tasa de supervivencia a 5 años es del 82%, 48% cuando la lesión se extiende a los nódulos linfáticos, y 26% cuando se presenta metástasis a distancia (Bsoul y col. 2005). El

pronóstico de los pacientes se ve afectado por factores individuales (edad, género, síntomas y co-morbilidad), factores relacionados a la neoplasia (anormalidades genéticas, tipo y grado histológico, invasión neural y vascular y proliferación tumoral) y factores asociados al tratamiento (técnica quirúrgica y dosis e intensidad de la radiación y/o quimioterapia) (Bsoul y col. 2005).

La detección temprana y el diagnóstico oportuno del cáncer bucal representan herramientas importantes para el manejo y pronóstico de la enfermedad, con el potencial de prevenir al menos 37,000 muertes por CB en el mundo cada año (Sankaranarayanan y col. 2006). El tratamiento del CB en etapas avanzadas es prolongado, complejo y costoso, además de ser mutilante y deletéreo, produciendo consecuencias físicas, nutricionales, sociales y psicológicas que afectan considerablemente la calidad de vida de los pacientes (Chandu y col. 2006).

La inspección visual de la cavidad bucal es un método simple, económico, no invasivo y eficaz para la identificación de lesiones precancerosas y neoplasias malignas tempranas, que se traduce en una mayor sobrevida de los pacientes afectados (Sankaranarayanan y col. 2006).

1.3 Factores de riesgo para el cáncer en la mucosa bucal

El tabaco y el alcohol han sido reconocidos como los dos principales factores de riesgo en el desarrollo de cáncer bucal (Castellsagué y col. 2004, Johnson 2001), la mayor parte de las veces, actuando en forma sinérgica (Castellsagué y col. 2004).

1.3.1 Tabaco

La combustión del tabaco produce un aerosol que contiene cerca de 10^{10} partículas por ml. y 4,800 compuestos (Pfeifer y col. 2002). La fase de vapor representa cerca del 90% del resultado de la combustión, compuesta por nitrógeno, oxígeno y dióxido de carbono. Los carcinógenos presentes en la fase de vapor incluyen óxido de nitrógeno, isopireno, butadieno, benceno, estireno, formaldehído, acetaldehído, y furano (Pfeifer y col. 2002). La fase particulada contiene por lo menos 3500 compuestos, muchos de los cuales son carcinógenos, incluyendo hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH), nitrosaminas, aminas aromáticas y metales (Pfeifer y col. 2002).

Existe suficiente evidencia de que las dos fases (de vapor y particulada) constituyentes del tabaco inhalado, causan tumores en animales de laboratorio, y que los promotores tumorales y co-carcinógenos están involucrados en la respuesta observada (Pfeifer y col. 2002). Por otro lado, se ha demostrado que en tumores malignos de mucosa bucal y esofágica, la mutación de p53 es proporcional al consumo de tabaco, los individuos con alto consumo de tabaco tienen un riesgo cuatro veces mayor de mutación que aquellos que no fuman (Pfeifer y col. 2000)

El uso de cada uno de los tipos de tabaco se relaciona de manera directa con el sitio de la mucosa bucal en la que la lesión pre-maligna o maligna se presenta. En un estudio retrospectivo (Schmidt y col. 2004), se encontró una asociación significativa entre el uso de tabaco inhalado y el piso de boca y los bordes postero-laterales de la lengua, confirmando que estos sitios son particularmente susceptibles a los efectos carcinógenos del tabaco. Estos

sitios también se consideran de alto riesgo debido a que reciben las concentraciones más altas de los carcinógenos contenidos en el tabaco inhalado (Schmidt y col. 2004).

La ausencia de queratina en el piso de boca y el vientre de lengua pudiera contribuir a la vulnerabilidad de esos sitios a los carcinógenos. En contraste, se ha sugerido que la queratina puede actuar como un agente protector en la encía, lo cual explica las bajas tasas de cáncer asociado a tabaco inhalado en este sitio (Schmidt y col. 2004).

1.3.2 Alcohol

El uso de alcohol ha sido considerado un promotor del cáncer bucal en virtud de su capacidad para permeabilizar los tejidos bucales, e incrementar así la retención y acumulación de carcinógenos (Howie y col. 2001). El alcohol tiene también un efecto metabólico sobre la acción carcinógena, por ejemplo, el alcohol puede estimular la actividad de los peroxisomas y microsomas, organelos involucrados en los procesos metabólicos oxidativos celulares. El consumo de alcohol puede promover el desarrollo de cáncer bucal por aumento en la actividad de varios carcinógenos como las nitrosaminas encontradas en el tabaco (Schwartz 2000).

Los efectos carcinogénicos del alcohol se relacionan directamente con el nivel de alcohol consumido. Se ha sugerido que el alcohol potencia el efecto carcinogénico del tabaco, independientemente de la cantidad de tabaco consumida. Sin embargo, este efecto es mayor con altos niveles de exposición, y la magnitud del efecto es al menos aditiva, pudiendo llegar a ser multiplicativa, dependiendo del sitio de aparición del cáncer y los niveles de exposición (Kufe y col. 2003).

El aumento en la frecuencia del cáncer bucal en el mundo occidental se ha asociado con el aumento en el consumo de alcohol (Johnson 2001). El alcohol es el principal factor de riesgo para CBO en los individuos sin historia de consumo de tabaco; en un estudio de casos y controles realizado en no fumadores, se encontró que 50% de los casos referían uso de alcohol, el riesgo de desarrollar cáncer para aquellos que bebían más de 3 unidades de bebida al día fue de 3.4 (IC 95% 1.1-10.1) (Fioretti y col. 1999).

Los mecanismos por los cuales las bebidas alcohólicas inducen procesos malignos en la mucosa bucal han sido poco estudiados. La explicación más frecuente es que el alcohol o sus metabolitos, como el acetaldehído, son compuestos carcinogénicos; sin embargo, no hay una evidencia contundente de que el etanol (un ingrediente común en todas las bebidas alcohólicas) tenga una asociación importante en el desarrollo de cáncer bucal (Castellsagué y col. 2004). Además del efecto sistémico que induce, se ha sugerido que el etanol es convertido en acetaldehído en la saliva, actuando como carcinógeno en la mucosa del tracto gastrointestinal superior (Castellsagué y col. 2004).

Por otro lado, se ha sugerido que el alcohol puede actuar como co-carcinógeno a través de diferentes mecanismos: i) al aumentar la permeabilidad de la mucosa, permitiendo la entrada de otros agentes carcinógenos, ii) al inducir, local y sistémicamente, la activación de las enzimas involucradas en el metabolismo de los carcinógenos del tabaco y iii) por efecto oxidativo directo en el epitelio (Castellsagué y col. 2004).

1.3.3 Factores nutricionales

Diversos estudios han demostrado que los factores dietéticos juegan un importante papel en el riesgo de cáncer bucal. La reducción en el consumo de frutas y vegetales puede contribuir al desarrollo de CB (Conway 2007; Pavia y col. 2006; Kufe y col. 2003). Existe evidencia de que la vitamina A y los beta-carotenos son los responsables del efecto protector para CB que brindan las dietas ricas en frutas y vegetales, debido a que la deficiencia de carotenoides es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer bucal, orofaríngeo y pulmonar (Conway 2007; Negri y col. 2000; McLaughlin y col. 1988). La ingesta de alimentos ricos en vitamina C y E, provee un efecto protector en el desarrollo de CB (Negri y col. 2000). La evaluación de los componentes dietéticos es difícil, así como la validez de sus resultados, por lo que son necesarios estudios que evalúen específicamente y de manera precisa la relación entre la ingesta y los niveles séricos de varios componentes de la dieta.

1.3.4 Antecedentes familiares de cáncer

Los resultados sobre la asociación entre el riesgo familiar de cáncer y la presencia de cáncer de la región de cabeza y cuello no han sido consistentes (Mork y col. 1999). En un estudio de casos y controles poblacional en Estados Unidos (Goldstein y col. 1994) se identificó un riesgo elevado de cáncer faríngeo (OR=1.7) en individuos con historia familiar de cáncer en primera línea. Asimismo, en un estudio holandés de casos y controles hospitalarios, Cooper y col. (1995) encontraron un riesgo relativo de 3.5 para cáncer de cabeza y cuello en individuos con historia familiar de cáncer de vías respiratorias altas, aunque el riesgo fue detectado solo en hermanos. Mork y col. (1999) encontraron que el riesgo de presentar cáncer de cabeza y cuello en individuos menores de 45 años y con historia familiar de cáncer en primera línea fue de 5.0 (IC 95%, 1.4 – 17.3).

Sin embargo, en la mayoría de estudios se menciona que, además del sesgo de recuerdo implícito en la recolección de esta variable que disminuye la confiabilidad del resultado, los hábitos familiares en el consumo de tabaco pudieran incorporar sesgos en su interpretación. Por otro lado, en la mayoría de los estudios en los que se han incluido los antecedentes familiares de cáncer como posible factor de riesgo, los grupos estudiados han sido menores de 45 años (Mork y col. 1999, Goldstein y col. 1994), en quienes diversos factores ambientales pudieran jugar un papel importante en la etiología del cáncer de cabeza y cuello.

1.3.5 Agentes biológicos

La presencia de cáncer bucal se ha asociado a diversos tipos virales, como el Virus del Papiloma Humano (neoplasias epiteliales), el Virus Epstein-Barr (neoplasias linfáticas), el Virus del Herpes Simple tipo 8 (lesiones de Sarcoma de Kaposi), y recientemente el Virus del Herpes Simple 1 y 2, que pueden actuar como co-carcinógenos en presencia de tabaco u otro carcinógeno químico (Pagano y col. 2004, Johnson 2001).

En la mayoría de los virus que participan en la tumorigénesis, el genoma viral persiste en forma integrada o episomal, y los genes virales se sobre-expresan en las células tumorales. Sin embargo, algunos de ellos no son oncogénicos *per se*, la transformación celular ocurre de manera indirecta, o contribuyen en mayor medida a la progresión tumoral que a la generación del tumor (Pagano y col. 2004).

1.4 Virus del Papiloma Humano

El Virus del Papiloma Humano (VPH), perteneciente a la familia *Papillomaviridae*, es responsable del desarrollo de lesiones epiteliales benignas y malignas en la piel y mucosas. A pesar de que se ha aislado y secuenciado el genoma completo de poco más de 100 tipos de VPH, los datos recientes indican que existen más de 200 tipos diferentes (Bernard 2005).

1.4.1 Nomenclatura

La clasificación de los papilomavirus se basa en homologías en la secuencia de sus nucleótidos debido a que las proteínas que conforman la cápside de todos los tipos son antigénicamente similares. Los tipos de VPH muestran entre sí una diversidad en la secuencia de nucleótidos del gen L1 de por lo menos el 10%. El término “subtipo” se utiliza para definir aquellos papilomavirus que tienen en el gen L1 secuencias diferentes a los demás tipos en 2 a 10% de los nucleótidos. Finalmente, las variantes de VPH difieren en hasta el 2% del genoma prototipo (Bernard 2005).

Adicionalmente, como se observa en el Cuadro 1, los VPH han sido subdivididos en dos grupos con base en la lesión que son capaces de producir después de la infección (Muñoz y col. 2003). Los virus de bajo riesgo se han asociado con lesiones proliferativas benignas, en tanto que los virus de alto riesgo presentan un riesgo incrementado de desarrollar neoplasias malignas (Zhang y col. 2004).

Cuadro 1. Clasificación epidemiológica de los papilomavirus (Muñoz y col. 2003).

Clasificación del riesgo	Tipos de VPH
Alto riesgo	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
Probable alto riesgo	26, 53, 66
Bajo riesgo	6, 11, 13, 32, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108

1.4.2 Organización general del genoma

Los papilomavirus, simétricos e icosaédricos, no poseen envoltura, aunque si una cápside viral compuesta por una proteína mayor y una menor. Setenta y dos capsómeros rodean el ADN circular y de doble hélice formado por alrededor de 8 000 pares de bases (pb) (García-Carrancá y col. 1993).

Tomando como referencia al VPH-16, se distinguen tres regiones principales (temprana, tardía y región larga de control). En la región temprana (E) se encuentran todos los genes reguladores de la transcripción, replicación y ciclo viral; en la región tardía (L) se encuentran los genes que codifican las proteínas mayor (L1) y menor (L2) de la cápside viral. La región larga de control (LCR) o región no codificante, de aproximadamente 1,000 pb, contiene los elementos cis-regulatorios de la transcripción viral, como el promotor (p97) y el origen de replicación (ori) (Bernard 2005).

Como se observa en la Figura 1, la información genética se encuentra codificada en una sola de las cadenas de ADN, debido a que los genes tienen una sola orientación transcripcional, con sobreposición de algunos de ellos (García-Carrancá y col. 1993). Las

proteínas de expresión temprana (early) tienen funciones específicas: E1 participa en el inicio de la replicación viral, E2 participa en la regulación de la transcripción, E4 participa en la ruptura de citoqueratinas, E5 es una proteína transformadora de membranas, E6 degrada p53 y activa telomerasa, y E7 se une a pRB, p130 y c-jun (García-Carrancá y col. 1993).

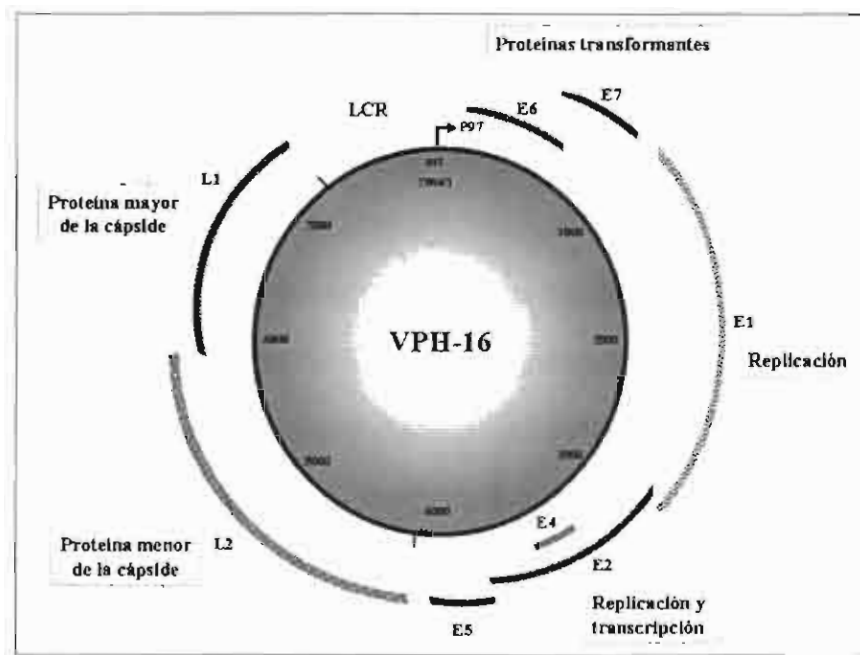


Figura 1. Organización genómica del VPH-16. Se observan las dos proteínas tardías virales, y las seis tempranas, así como sus principales funciones proteicas (Adaptado de <http://www.medscape.com>).

A nivel molecular, el principal mecanismo de oncogénesis del VPH es la disrupción de genes supresores de tumores hospederos a través de sus genes tempranos, lo cual resulta en desregulación del crecimiento celular e inhibición de la apoptosis. Los genes E6 y E7 se sobreexpresan como consecuencia de la delección de la región E2 en el genoma integrado del virus; E2 ordinariamente reprime la expresión de E6 y E7 en el promotor, con ganancia de sitios de procesamiento celular. E7 causa degradación proteosomal de pRB y sus proteínas

asociadas, por lo que el crecimiento celular se desregula; E6 causa degradación de p53, y como consecuencia, un crecimiento anormal de las células por inhibición de la apoptosis (Pagano y col. 2004).

Los productos de los oncogenes E6 y E7 inducen el mantenimiento del estado inmortalizado de las células que contienen secuencias de VPH. Los genes se expresan selectivamente en los tumores y líneas celulares derivadas de tumores humanos y se conservan intactos durante la integración del ADN viral al genoma celular (García-Carrancá y col. 1993).

En VPH-16 y 18, la proteína E6 interactúa con el regulador antioncogénico p53, conduciendo a la degradación de la proteína p53, con lo que se pierde la capacidad de reparar daños a nivel de ADN o de iniciar la apoptosis cuando el daño es irreparable. La proteína E6 de los VPH de bajo riesgo 6 y 11 no induce degradación de p53, lo que le confiere su débil potencial de transformación (García-Carrancá y col. 1993; Halbert y col. 1991).

El producto del gen E7 presenta funciones regulatorias transcripcionales, y en conjunto con E6 es capaz de transformar e immortalizar células *in vitro* (Halbert y col. 1991). Además, E7 controla el ciclo celular interactuando con el regulador anti-oncogénico P105 Rb y otras proteínas asociadas a Rb, lo que da como resultado la activación del ciclo celular en la célula infectada de forma desregulada (Ruesch y Laimins, 1997)

La proteína E7, al asociarse con la proteína pRB, libera el actor transcripcional E2F-1, que se encuentra unido a pRB. El factor E2F1 activa la transcripción de diferentes

genes celulares que promueven la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la S. Todo esto lleva consigo la pérdida del control del ciclo celular y es responsable de la inestabilidad genómica que precede a la transformación celular (Wiest y col. 2002; García-Carrancá y col. 1993).

La expresión de oncogenes virales E6 y E7 representa un indicador de la relación causal entre VPH y el cáncer bucal, en analogía con lo que sucede con el cáncer cérvico-uterino (CaCU) (Wiest y col. 2002), sin embargo, de igual importancia es la inactivación funcional de pRB para el control del ciclo celular. Se ha propuesto que la detección de VPH en el cáncer de cabeza y cuello debe acompañarse del análisis de la expresión del gen E6 (Wiest y col. 2002).

1.4.3 Especificidad tisular y ciclo viral

La infección por VPH se limita a epitelios escamosos (piel y mucosas) y ocurre solo en las células basales del epitelio en división. La infección por papilomavirus ocurre por contacto directo. Comienza en las células basales, las cuales son mitóticamente activas, y posteriormente el virus permanece en el estrato basal, se integra al genoma o se replica para producir partículas virales (Doorbar 2005).

El ADN del virus se replica, transcribe y es capaz de formar viriones completos a medida que las células epiteliales se diferencian (Doorbar 2005). Las células basales son poco activas en la expresión de proteínas virales ya que existen factores celulares que regulan la transcripción viral. Al migrar a las capas superficiales, estas células se diferencian y ya no pueden dividirse, y es entonces cuando, tras la transcripción de los genes tempranos

y tardíos del VPH, inicia la producción de partículas virales (Doorbar 2005; Munger y col. 2004). En células completamente diferenciadas el virus se replica con un alto número de copias y expresa entonces sus genes tardíos L1 y L2. Debido a que se trata de virus no líticos, se vierten al medio extracelular dentro del epitelio escamoso (Doorbar 2005).

Como se observa en la Figura 2, el genoma del VPH se replica como un episoma extracromosómico (plásmido) en las lesiones benignas; sin embargo, el ADN viral se ha encontrado integrado con mucha frecuencia dentro del cromosoma hospedero en las lesiones malignas de cuello uterino, generalmente amplificados en unas 5-200 copias por célula (García-Carrancá y col. 1993).

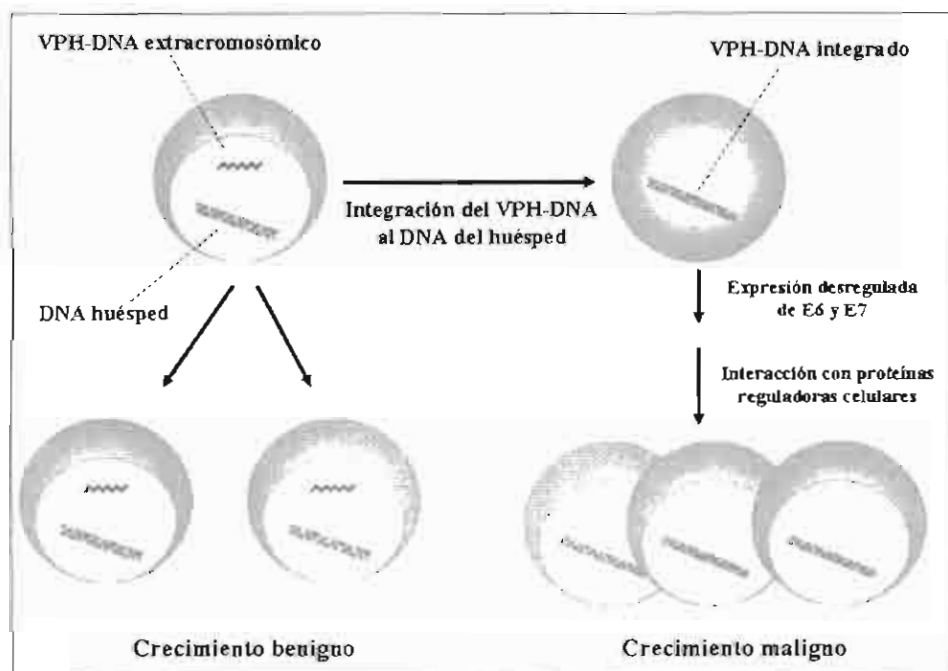


Figura 2. Modelo de transformación maligna del VPH-16 y 18. En las lesiones benignas, el ADN viral se conserva en forma de plásmido, en contraste con la integración del ADN viral al ADN hospedero observado en los crecimientos malignos (Adaptado de Beutner y Tying, 1997)

La integración al genoma del hospedero se da en la región E1-E2 del virus, provocando su rompimiento, por lo que ya no se sintetiza una proteína E2 funcional. Al ser la proteína E2 un factor que regula negativamente la expresión de los genes E6 y E7 (se une a su promotor), se tiene como consecuencia un aumento en la transcripción de dichos genes (Sang y Barbosa, 1992).

Se ha sugerido que la integración es un evento temprano en la carcinogénesis inducida por papilomavirus (Syrjänen 2005). En un estudio realizado en muestras de CB positivas a VPH-16, se encontró que el 48% tiene el virus integrado al cromosoma hospedero, 35% se encuentra en forma episomal, y 17% en ambas formas (Koskinen y col. 2003). Snidjers y col. (1992) encontraron que los carcinomas de amígdala positivos a VPH-16 se encuentran en forma episomal, en contraste con los carcinomas positivos a VPH-33 que se encuentran en forma integrada y en formas combinadas (episomal-integrada).

1.4.4 Diagnóstico molecular

El método de obtención de ADN reviste gran importancia para la óptima detección del VPH. En ADN purificado de biopsia, el mayor índice de detección viral se logra a través de tejido fresco, el análisis en bloque de parafina disminuye la sensibilidad de detección de 51.6% a 21.7% (Miller y White, 1996). Sin embargo, debido a que representa una estrategia inocua e indolora, en los últimos años se ha adoptado el uso de cepillados, raspados y enjuagues de la mucosa bucal. Sugiyama y col. (2003) informan que el uso de estas técnicas puede subestimar la prevalencia real de VPH, ya que la mayor cantidad de copias virales se encuentran en estratos profundos del epitelio (Sugiyama y col. 2003). Sin embargo, la mayoría de estudios (Furrer y col. 2006; Lawton y col. 1992; Syrjänen y

Syrjänen, 1989) coinciden en que los más altos índices de detección de HPV-ADN se logran por medio del enjuague bucal, el raspado y el cepillado de la mucosa bucal.

El método de extracción de ADN también puede afectar el índice de detección viral, en un estudio reciente fueron comparados cinco métodos diferentes para la purificación de ADN a partir de enjuagues bucales: digestión con proteinasa K (PKD) e inactivación por calor, PKD y precipitación con etanol, PKD y extracción con fenol-cloroformo, QIAamp ADN Blood Midi kit, y Puregene ADN purification kit, siendo este último el que mayor detección de ADN-VPH ofrece a través de amplificación del ADN con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (D'Souza y col. 2005).

Los métodos usados para el diagnóstico de la infección por VPH están basados principalmente en la detección del ADN viral, y han sido agrupados en ensayos de alta sensibilidad (PCR, 37.1%), y ensayos de moderada (southern blot, 25.2%) y baja sensibilidad (hibridación *in situ* o inmunohistoquímica, 16.9%) (Miller y White, 1996). La técnica más utilizada para la detección de ADN-VPH es la PCR, debido a su alta sensibilidad, accesibilidad y bajo costo (Molijn y col. 2005). En muestras de ADN obtenido a través de la mucosa bucal la PCR anidada con oligonucleótidos MY09/MY11 y GP5+/6+ es el método más sensible y reproducible en la actualidad (Remmerbach y col. 2004).

1.4.5 Asociación del Virus del Papiloma Humano con el cáncer bucal

Desde que en 1983, Syrjänen y col. (1983) reportaron la relación entre VPH y cáncer bucal, numerosos estudios epidemiológicos han identificado al virus en muestras de mucosa normal, lesiones premalignas y malignas. Existe evidencia biológica de que el gen E6 del

VPH y las oncoproteínas del gen E7 producen inmortalización y transformación de los queratinocitos de la mucosa bucal, lo que sugiere que la presencia del virus constituye un factor importante en la etiología del cáncer bucal (Sexton y col. 1993; Oda y col. 1996).

En cáncer bucal y orofaríngeo, se han reportado frecuencias de papilomavirus que varían del 0 al 100% (Ha y Califano, 2004); esta diversidad es debida posiblemente a las diferencias en los métodos seguidos por los diferentes estudios, entre las que destacan el número de casos incorporados, la población sujeta a estudio, el método y sitio de recolección de la muestra, la técnica de extracción de ADN, y el método molecular utilizado para la detección del ADN viral.

A pesar de esta variabilidad, la asociación de VPH-16 con el desarrollo de tumores malignos de cabeza y cuello ha sido bien demostrada (Ha y col. 2004; Gillison y Lowy, 2004; Gillison y col. 2000). En un estudio de casos y controles anidado se encontró que los pacientes seropositivos a VPH-16 tienen un riesgo 14.4 de desarrollar cáncer orofaríngeo (Mork y col. 2001).

Los papilomavirus 16 y 18 son los tipos que se han asociado con mayor frecuencia con el desarrollo de cáncer bucal; se ha sugerido que su papel oncogénico se fundamenta en la disrupción de genes protectores o la activación de oncogenes por medio de la integración del cromosoma viral (Chang y col. 2003), o por la expresión de los genes E6 y E7 que pueden inactivar e inducir la degradación de los productos de los genes supresores de tumores p53 y pRB (García Carrancá y col. 1993). Si bien, se han encontrado estos tipos de alto riesgo en mucosa normal, en virtud de que los queratinocitos son capaces de albergar a

los papilomavirus en forma latente (Chang y col. 2003), la probabilidad de detectar VPH en CB es aproximadamente 4.7 veces más alta que la de encontrarlo en mucosa bucal normal (Miller y Johnstone, 2001).

1.4.5.1 Género

A pesar de que en la mucosa genital el virus del papiloma humano afecta preponderantemente al género femenino, y de que la infección en hombres no produce síntomas ni lesiones visibles (Leyva-López y col. 2003), en la mayoría de los estudios que involucran la mucosa del tracto aerodigestivo superior no se reportan diferencias en los patrones de distribución del virus respecto al género, en mucosa normal o lesiones premalignas (Sugiyama y col. 2003), ni en procesos malignos (Giovanelli y col. 2002; Herrero y col. 2003; Ibieta y col. 2004; Tachezy y col. 2005). Sin embargo, Ritchie y col. (2003), en un estudio realizado en 139 muestras de cáncer bucal y orofaríngeo, encontraron que los hombres tienen casi tres veces más probabilidades de presentar VPH en la mucosa bucal que las mujeres (OR= 2.9, 95% IC= 1.0 - 8.6).

1.4.5.2 Edad

Los resultados sobre la prevalencia de papilomavirus en neoplasias malignas de cabeza y cuello y la edad son contradictorios. Se ha descrito que los individuos jóvenes con cáncer bucal tienen mayor riesgo de presentar infección por VPH (Strome y col. 2002; El-Mofty y Lu 2003; Hafkamp y col. 2004; Smith y col. 2004); otros estudios sugieren que a mayor edad, mayor probabilidad de tener VPH (Giovanelli y col. 2002; Lindel y col. 2001). Sin embargo, en diversos trabajos (Herrero y col. 2003; Tachezy y col. 2005; Sisk y col. 2002) se ha demostrado que la frecuencia de VPH en individuos jóvenes no es diferente

respecto a pacientes mayores, sugiriendo que el rol oncogénico del VPH es similar en todos los grupos de edad.

1.4.5.3 Tabaco y alcohol

Con base en hallazgos moleculares y epidemiológicos, se sabe que las neoplasias malignas asociadas a VPH, sin exposición a tabaco o alcohol, tienen un comportamiento biológico diferente que aquellas causadas por estos agentes carcinogénicos (Sugerman y Shillitoe, 1997), y que además, las células infectadas por papilomavirus tienden a ser más susceptibles a la acción de estos carcinógenos (Steinberg y DiLorenzo, 1996).

Aunque en estudios previos (Fouret y col. 1997; Smith y col. 1998) se informó que los individuos no fumadores eran más susceptibles a adquirir VPH y que la infección viral podía actuar de manera sinérgica con la exposición a tabaco y alcohol, en los últimos años se ha reportado que la mayor proporción de neoplasias malignas positivas a VPH corresponde a pacientes no fumadores y no bebedores (Tachezy y col. 2005; Gillison y col. 2004, Halkamp y col. 2004; Smith y col. 2004; Chang y col. 2003; Herrero y col. 2003; Ritchie y col. 2003; Lindel y col. 2001; Gillison y col, 2000; Mellin y col. 2000).

Koch y col. (1999) sugieren que los mecanismos de carcinogénesis del VPH entre fumadores y no fumadores son diferentes, debido al efecto protector que confiere el tabaco. La producción aumentada de queratina en las superficies normalmente paraqueratinizadas hace a la mucosa más resistente a trauma, uno de los mecanismos necesarios para la infección por VPH en células basales.

1.4.5.4 Localización

Se ha observado una mayor prevalencia de la infección en tumores orofaríngeos que en aquellos que se presentan en la mucosa bucal (Tachezy y col. 2005; Ritchie y col. 2003; Smith y col. 2004, Dahlgren y col. 2004), principalmente en amígdala (Hafkamp y col. 2004; Mellin y col. 2000), y en base de lengua (Dahlgren y col. 2004).

Los papilomavirus, particularmente el VPH-16, se encuentran con mayor frecuencia en neoplasias originadas en sitios con actividad inflamatoria, como el cérvix, las amígdalas y la base de lengua. Al parecer, las células infectadas con VPH, al encontrarse en cercanía a células inmunológicamente competentes capaces de responder a antígenos induciendo la producción de factores de crecimiento, pueden también estimular la división celular de las células infectadas facilitando el desarrollo tumoral (Dahlgren y col. 2004).

1.4.5.5 Vías de transmisión

La forma en la que el VPH es transmitido a la mucosa bucal aún no está clara; el ADN-VPH ha sido identificado en cepillados de individuos sanos en frecuencias que varían del 1 al 60% (Scully 2002); sin embargo, en el fluido salival no se han encontrado cargas virales elevadas, lo que hace poco probable su transmisión por contacto directo (Scully 2002). El virus ha sido encontrado en recién nacidos de madres infectadas debido a transmisión vertical (Watts y col. 1998), y en niños y adolescentes sin actividad sexual (Koch y col. 1997).

Un gran número de estudios han sido desarrollados con el fin de identificar al VPH en la mucosa bucal como un patógeno adquirido por vía sexual. En estudios de casos y

controles, se han encontrado asociaciones significativas entre la presencia de VPH en CB y el número de parejas sexuales y la historia de prácticas oro-genitales y oro-anales (Herrero y col. 2003; Ritchie y col. 2003; Schwartz y col. 1998). Además, se han identificado tumores bucales positivos a VPH-AR en hombres cuyas compañeras sexuales tuvieron lesión de cuello uterino asociada a VPH (Smith y col. 2004).

1.4.5.6 Asociaciones genéticas

A diferencia de estudios en los que no se ha encontrado mutación del gen supresor de tumores p53 (Gillison y col. 2000; Haraf y col. 1996), en otros se ha demostrado que los tumores positivos a VPH muestran polimorfismos y mutación en TP53 (Dai y col. 2004, Van Houten y col. 2001), desregulación de pRB y sobreexpresión de p16INK4A (Hafkamp y col. 2004).

En general, los tumores positivos a VPH-16 han sido descritos como dos tipos genéticamente diferentes: aquellos que exhiben represión del gen E6 sin mutaciones en el gen p53, y los que, alternativamente presentan expresión de E6 y mutaciones en p53 (Wiest y col. 2002; Van Houten y col. 2001). Se ha observado que la radioterapia y los agentes citotóxicos son capaces de disminuir la posibilidad de que E6/E7 interfiera con p53 y pRB en los tumores con alta expresión de E6/E7, por lo que este tipo de neoplasias son más vulnerables a la terapia (Mellin y col. 2002).

Adicionalmente, se ha demostrado que los niveles de proteína pRB están regulados negativamente en el cáncer de cabeza y cuello asociado a VPH-16, lo que permite inferir actividad de E7 (Wiest y col. 2002). Por otro lado, se ha sugerido que existe una fuerte

asociación entre la infección por VPH y la activación del gen H-ras en el carcinoma verrucoso de la mucosa bucal (Anderson y col. 1994).

1.4.5.7 Pronóstico

Ritchie y col. (2003), reportan que el estado al VPH es un factor independiente del pronóstico en cáncer bucal orofaríngeo, y que la sobrevida de los pacientes no está asociada con la radioterapia en los tumores positivos a VPH; sin embargo, al analizarlo por género, encuentran que los hombres positivos a papilomavirus tienen un mejor pronóstico que las mujeres.

En numerosos estudios se ha relacionado la presencia VPH en CBO, con un mayor tiempo de sobrevida (Dahlgren y col. 2004; Hafkamp y col. 2004; Li y col. 2003; Ritchie y col. 2003; Mellin y col. 2002, Lindel y col. 2001; Gillison y col. 2000, Mellin y col. 2000), así como una mejor respuesta a radioterapia en tumores VPH positivos (Lindel y col. 2001). Asimismo, en un estudio longitudinal que incluyó 22 individuos con carcinoma epidermoide de amígdala, se observó que los pacientes con tumores de ≥ 190 copias de VPH tuvieron un mejor resultado clínico, permaneciendo libres de tumor tres años después del diagnóstico; al parecer, estos pacientes tienen un mejor pronóstico debido a que la carga viral alta puede inducir una mejor respuesta inmune contra el cáncer (Mellin y col. 2002).

A pesar de que Higa y col. (2003) reportan que los tumores positivos a VPH son con mayor frecuencia bien diferenciados, en diversos estudios (Smith y col. 2004; Klussman y col. 2001; Schwartz y col. 1998) las neoplasias positivas a VPH se han correlacionado con neoplasias mal diferenciadas, no queratinizantes y con morfología basaloide (OR= 18.7, IC

95%= 2.1 - 167) (Gillison y col. 2000). Debido a los hallazgos inconstantes reportados hasta hoy en la literatura con respecto a la agresividad, pronóstico, y sobrevida de las neoplasias positivas a VPH, consideramos necesario analizar estas variables por medio de más estudios que incorporen diseños longitudinales de largo plazo.

1.5 Regulación epigenética

El término epigenético hace referencia a los mecanismos de regulación génica independientes de la secuencia de ADN, que ocurren sin una alteración en la secuencia de nucleótidos (Rodríguez-Dorantes y col. 2004). Un mecanismo epigenético es un sistema complejo para utilizar selectivamente la información genética, activando y desactivando diversos genes funcionales. La regulación epigenética ocurre en al menos tres sitios en la estructura jerárquica del genoma: en el ADN, a través de la metilación, en los nucleosomas, a través de la modificación de histonas, y en los cromosomas, por medio de proteínas estructurales (Recillas-Targa y col. 2006; Bunger y Archer, 2004).

Estas señales y las proteínas responsables de ellas, pueden influenciar la expresión génica a nivel global, compactando o relajando grandes segmentos del genoma, o a nivel local, como co-activadores y represores de la expresión génica. La señalización es dependiente de enzimas y está altamente regulada (Bunger y Archer, 2004).

Las características comunes de los cambios epigenéticos son: 1) su potencial reversibilidad, lo cual es lo contrario a lo que sucede con la mutación genética; 2) efecto de posición, ejemplo de ello es el efecto de los genes a distancia, que puede diferir con la distancia del gen afectado desde la marca epigenética, o terminar de manera abrupta; 3)

efectos en grupos de genes cercanos unos de otros en el genoma; 4) una mayor frecuencia de alteraciones que en las mutaciones; 5) pueden ser modificadas por el ambiente. El mecanismo principal de las características anteriormente descritas radica en la cromatina, incluyendo la modificación post-traducciona l de histonas, el arreglo de los nucleosomas, y la metilación de citosinas en el ADN (Feinberg 2004).

1.5.1 Metilación

La única modificación epigenética del ADN en mamíferos es la metilación de la citosina en un dinucleótido CpG (Robertson 2005). Este mecanismo de control es importante durante el desarrollo embriológico de los mamíferos, y ha recibido especial atención en los últimos años debido a su contribución en el proceso de carcinogénesis (Rodríguez-Dorantes y col. 2004).

La metilación del ADN es un marcador epigenético con aplicación en diversos campos de investigación de la genética y la biomedicina (Mesa-Cornejo y col. 2006). La modificación del estado de metilación del ADN puede afectar la expresión de genes que están inactivados por modificación epigenética incorrecta, por lo que el uso de drogas que inhiben la metilación del ADN, puede ser útil para el tratamiento y control del cáncer (Arenas-Huertero y Recillas-Targa 2002)

La metilación del ADN participa en la regulación de la expresión génica de dos formas, directamente al impedir la unión de factores de transcripción, e indirectamente propiciando la estructura “cerrada” de la cromatina. El ADN presenta regiones de 100-1500 pb ricas en dinucleótidos CpG (islas CpG), que son reconocidas por las enzimas ADN-

metiltransferasas (DNMTs). Durante la replicación del ADN, las DNMTs metilan el carbono 5 de las citosinas de la cadena recién sintetizada, manteniéndose así la memoria del estado metilado en la molécula hija. La metilación es un proceso unidireccional, cuando una secuencia CpG adquiere metilación *de novo*, esta modificación se hace estable y es heredada como un patrón de metilación clonal (Mesa-Cornejo y col. 2006).

Los patrones de metilación en las células somáticas son generalmente estables y heredables, sin embargo, son reprogramados ampliamente en las células germinales y durante el desarrollo embrionario temprano, siendo la metilación *de novo* particularmente activa en estos estadios (Rodríguez-Dorantes y col. 2004).

En la metilación *de novo* de un dinucleótido CpG, el grupo metilo se añade a la posición 5 del carbono del anillo de pirimidina de la citosina, a través de metiltransferasas (DNMT3A y DNMT3B) en una de las hebras de ADN complementario. Si una de las islas CpG complementarias ya está metilada, la otra puede ser metilada en el proceso de mantenimiento de la metilación a través de la DNMT1 (Auerkari 2005).

La metilación afecta las interacciones ADN-proteína, la estructura y replicación del ADN, la expresión de los genes y la diferenciación celular, la latencia de virus celulares, y la inactivación transcripcional de elementos genéticos móviles, además de aumentar el riesgo de mutaciones espontáneas (Rodríguez-Dorantes y col. 2004). En células normales, la metilación ocurre predominantemente en regiones genómicas repetitivas, incluyendo ADN satélite y elementos parasíticos (transposones y retrovirus) (Robertson 2005).

La relación entre la metilación del ADN y el cáncer se demostró en 1983, al identificar hipometilación en el genoma de las células cancerosas, en comparación con su contraparte normal. Posteriormente, se describió que las islas CpG presentes en los promotores de células malignas están hipermetiladas, resultando en el silenciamiento de miles de genes, incluyendo genes supresores de tumor (Recillas-Targa y col. 2006; Issa 2004). Por otro lado, la pérdida de metilación genómica global es un evento temprano muy frecuente en cáncer, que se correlaciona con severidad de la enfermedad y potencial metastásico (Robertson 2005).

El genoma de células preneoplásicas, neoplásicas y senescentes, comparten tres cambios importantes en metilación. La hipometilación de la heterocromatina, que conduce a inestabilidad genómica e incrementa los eventos de recombinación mitótica; la hipermetilación de genes individuales, y la hipermetilación de las islas CpG de genes constitutivos y genes supresores de tumores (Mesa-Cornejo y col. 2006; Recillas-Targa y col. 2006). Los niveles de metilación pueden presentarse en forma individual o simultánea, aunque en general, la hipermetilación está involucrada con silenciamiento génico y la hipometilación, con sobre-expresión de proteínas involucradas en los procesos de invasión y metástasis (Mesa-Cornejo y col. 2006).

La Figura 3 muestra una región de ADN genómico de una célula normal, que contiene cromatina hipermetilada y un gen supresor de tumor (GST) activo transcripcionalmente, asociado a una isla CpG hipometilada. En las células tumorales, la heterocromatina, al estar hipometilada, contribuye a la inestabilidad genómica. Asimismo, las islas CpGs de células malignas pueden presentar metilación *de novo*, resultando en

silenciamiento de la transcripción de genes reguladores del crecimiento tumoral (Robertson 2005).

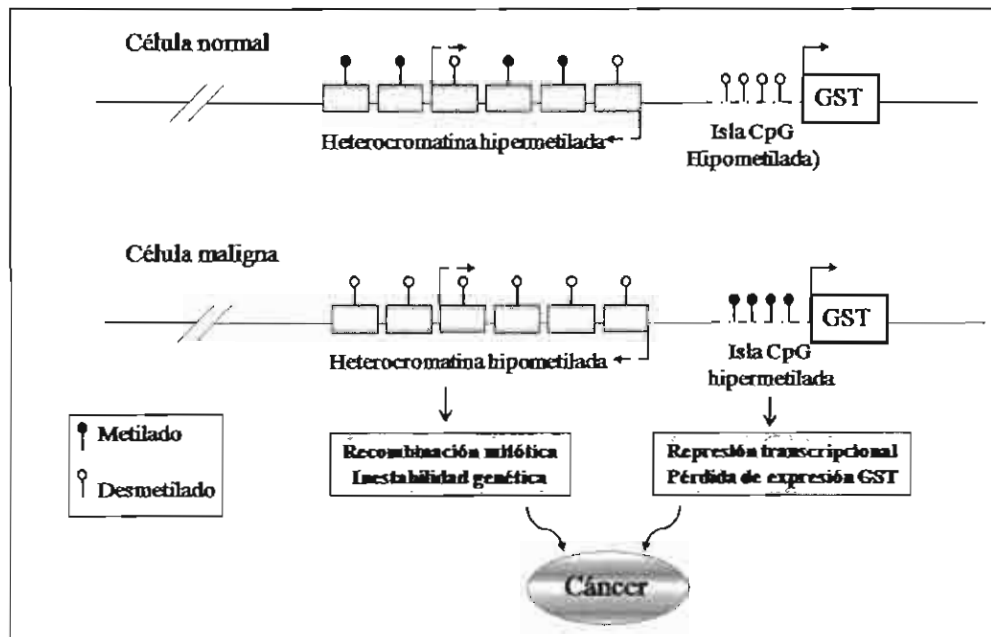


Figura 3. Metilación del ADN y cáncer. En una célula normal, se observa la región de heterocromatina hipermetilada, y la isla CpG asociada al gen supresor de tumor (GST) hipometilada. En contraste, en el cáncer, la hipometilación de la región de cromatina contribuye a inestabilidad genómica, y la metilación de la isla CpG provoca silenciamiento del GST (Adaptado de: Robertson 2005).

Aproximadamente la mitad de los genes promotores contienen una región rica en dinucleótidos CpGs, que en células normales se encuentran libres de metilación. En el cáncer, muchas de esas islas CpG están hipermetiladas, silenciando la expresión de genes contiguos, como los supresores de tumores (Recillas-Targa y col. 2006; Esteller 2000).

Entre los genes que se han encontrado silenciados por metilación aberrante se encuentra p16, p14, p15, APC (gen de la poliposis adenomatosa de colon), Retinoblastoma (Rb), LKB1/STK11 y los receptores de estrógenos y progesterona. La metilación aberrante también afecta la expresión de genes reparadores de ADN, como hMLH1, MGMT, GSTP1 y

BRCA1, con lo cual el ADN celular queda sin protección contra la exposición de agentes carcinógenos exógenos, adquiriendo nuevas modificaciones genéticas que inician el proceso oncogénico (Esteller 2000).

1.5.2 Metilación y cáncer bucal

Diversos cambios genéticos han sido estudiados en el cáncer de la cavidad bucal como mutaciones o pérdidas de secuencias de ADN, lo cual lleva a la pérdida de función de genes supresores tumorales, o activación de oncogenes. Estos cambios acumulativos pueden producir atipia celular y eventualmente cáncer (Ha y Califano, 2006).

A pesar de que son pocos los datos con los que contamos hasta la fecha, la caracterización de los patrones de metilación en estos genes es de gran importancia en el estudio del cáncer bucal. Debido a la sensibilidad y especificidad de los ensayos utilizados (especialmente, PCR cuantitativo específico de metilación), la determinación del estado de metilación del CB tiene un gran potencial en la detección temprana, monitoreo y tratamiento del CB (Ha y Califano, 2006). Algunos genes en lesiones premalignas bucales tienen cierto grado de metilación, por lo que se sugiere que la metilación es un evento temprano (Ha y Califano 2006).

La investigación sobre metilación en tumores de la mucosa bucal es reciente, cuatro importantes genes han sido estudiados con detalle: CDKN2A, CDH1, MGMT y DAPK1. Otros genes, como DBC1, p14, CDKN2B, RARB, RASSF1, MLH1, P73, DCC, FHIT y SERPIN B5, han sido estudiados en el contexto de la carcinogénesis bucal, aunque con menos detalle (Ha y Califano, 2006).

CDKN2A, un gen involucrado en la vía de Rb para el control del ciclo celular, se encuentra comúnmente alterado en el cáncer de cabeza y cuello. Datos obtenidos en líneas celulares muestran que entre el 17% y el 43% de los tumores de cabeza y cuello presentan metilación en la región promotora de CDKN2A (Ha y Califano, 2006); sin embargo, es necesario contrastar estos resultados con estudios basados en muestras clínicas.

Por otro lado, el gen CDH1 se ha descrito asociado a la adhesión celular en tumores malignos gastrointestinales, por lo que la metilación en su región promotora juega un papel importante en la invasión tumoral y metástasis. Los resultados reportados en estudios realizados en muestras de tumores de la cavidad bucal han sido muy variables, encontrando que el promotor de CDH1 está metilado del 0 al 85% de los casos (Ha y Califano, 2006).

MGMT es un agente detoxificante del ADN, importante en la prevención de alquilación y, por consiguiente, predictivo de quimiosensibilidad. MGMT se ha encontrado metilado en 38% de los tumores malignos primarios de colon, gliomas y tumores de cabeza y cuello. Finalmente, DAPK1, un grupo de genes envueltos en la apoptosis, se ha encontrado metilado en 7 a 68% de los tumores primarios de la mucosa bucal (Ha y Califano, 2006).

La caracterización de la metilación en genes promotores asociados al cáncer bucal ha revestido gran relevancia, sobre todo en los últimos años, por su papel como herramienta de detección temprana, monitoreo y tratamiento del cáncer bucal. La creación de paneles de metilación génica se propone como uno de los mecanismos para la búsqueda de individuos con riesgo de cáncer bucal. Ogi y col. (2002) encontraron que 67 de 97 CECB presentaban

metilación del promotor en 12 genes. Viswanathan y col. (2003), a través del estudio de la metilación en cinco genes asociados al cáncer bucal, identificaron la presencia de cáncer bucal en 38 de 51 pacientes de la India. Estos estudios demuestran que el diseño de paneles marcadores de metilación pueden ser útiles en la identificación de lesiones malignas en la cavidad bucal (Ha y Califano, 2006).

Por otro lado, en la determinación de márgenes quirúrgicos durante procedimientos oncológicos, la metilación ha sido sugerida como un instrumento confiable (Ha y Califano, 2006). Goldenber y col. (2004), cuantificaron el estado de metilación de los genes CDKN2A y MGMT por medio de PCR específico de metilación, con el fin de establecer márgenes de resección en cirugías de cabeza y cuello, sugiriendo que el análisis molecular de la metilación es una herramienta auxiliar en el acto quirúrgico.

1.5.3 Metilación del genoma del VPH

El estudio de los patrones de metilación del VPH ha sido realizado recientemente, en líneas celulares y muestras clínicas de neoplasias genitales y anales. En el ciclo de vida de la mayoría de los virus, la metilación del ADN no parece jugar un papel importante; sin embargo, diversos estudios han demostrado que VPH-16 y 18 están afectados de manera significativa por este mecanismo (Turán y col. 2006; Wiley y col. 2005; Badal y col. 2004; Badal y col. 2003; Kalantari y col. 2004).

La importancia de la metilación en el ciclo de vida del VPH-16 radica en que actúa como silenciador de la transcripción viral en células indiferenciadas, induciendo latencia viral (Kalantari y col. 2004; Doerfler y col. 2001). La hipermetilación del gen L1 del VPH-

16 y 18, y de la LCR del VPH-16 es común en CaCU y en lesiones de alto grado, y rara o ausente en infecciones asintomáticas o lesiones de bajo grado, posiblemente como consecuencia de recombinación genómica y transcripción aberrante (Kalantari y col. 2004).

En la LCR, se ha reportado hipermetilación en muestras de cuello uterino asintomáticas, metilación moderada en lesiones precursoras, e hipometilación en 6% de los carcinomas invasivos, lo cual sugiere que la transformación neoplásica puede ser suprimida por metilación de CpG, mientras que la desmetilación ocurre durante la transformación neoplásica (Kalantari y col. 2004).

La prevalencia de hipometilación indica que este fenómeno epigenético juega un papel importante en el ciclo de vida de los papilomavirus, la cual tiene lugar en infecciones asintomáticas y lesiones precursoras, pero no en carcinomas. Estas observaciones sugieren que la metilación en los dinucleótidos CpG se encuentra presente en el ciclo de vida del VPH así como en la etiología del cáncer, donde puede actuar como un marcador diagnóstico (Kalantari y col. 2004)

Durante la carcinogénesis, se ha observado con frecuencia una hipometilación global o regional e hipermetilación en islas CpG, esta metilación reprime la expresión genética, por interferencia directa al impedir la unión de los factores de transcripción o por unión de una familia de proteínas que reconocen ADN metilado y reclutan HDACS, las cuales favorecen la condensación de la cromatina y por lo tanto reprimen la transcripción. Parece ser que este mecanismo es el blanco de modificación por los complejos entre HDACS y los factores de transcripción CDP y YY1 (Kalantari y col. 2004).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Si bien, en diversos trabajos se ha establecido la asociación entre la infección por VPH y el desarrollo de cáncer bucal, los resultados han mostrado una amplia variabilidad. En México, la información sobre la frecuencia de VPH-AR es escasa, y la información con la que se cuenta no incluye individuos sanos, por lo que no se conoce la prevalencia de la infección en individuos sin cáncer bucal.

Por otro lado, a pesar de las altas frecuencias de VPH reportadas en cáncer bucal (74%) (Balaram y col. 1995), y del hallazgo de sobreexpresión de oncogenes virales E6 y E7 en la mucosa bucal afectada por procesos malignos, hasta el momento, no existe evidencia contundente relacionada al papel oncogénico del virus en la mucosa bucal. El estudio de la metilación viral en el genoma de VPH-16 en CB permitirá sugerir patrones oncogénicos similares a los observados en neoplasias ano-genitales asociadas a este mismo tipo viral.

JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de la frecuencia de VPH en pacientes con y sin cáncer bucal permitirá establecer la asociación entre la presencia del virus y el CB en pacientes mexicanos, que en conjunto con otros factores de riesgo (tabaco, alcohol), pudieran ser herramientas útiles en la caracterización de individuos con alto riesgo de cáncer bucal. Los datos obtenidos podrán ser contrastados con los informados en estudios previos, tanto a nivel mundial como en nuestro país. Adicionalmente, el uso del cepillado citológico para la identificación de VPH en la mucosa bucal, que representa un método no invasivo y de fácil uso en el consultorio dental, podrá ser utilizado como una herramienta clínica potencial en la identificación de pacientes en riesgo de CB, o con lesiones premalignas.

Por otro lado, a nivel mundial, no existen trabajos sobre cáncer bucal que hayan estudiado los patrones de metilación en el genoma del VPH-16. La modulación selectiva de los fenómenos epigenéticos, particularmente la metilación de ADN, podría tener implicaciones de importancia clínica, en el diagnóstico, la prevención y el tratamiento del cáncer. La caracterización de los patrones de metilación podrá ser una herramienta de utilidad en el establecimiento de la asociación causal del virus con el cáncer bucal.

En nuestro país, no existen programas de detección temprana de cáncer bucal, y no se contempla la detección de infección por VPH y sus patrones de metilación en mucosa bucal como indicadores de riesgo para CB.

HIPÓTESIS

El Virus del Papiloma Humano de alto riesgo en la mucosa bucal se asocia con la presencia de carcinoma epidermoide de la cavidad bucal.

Las islas CpG's en las posiciones genómicas 7049 a 115 del VPH-16 de cáncer bucal se encuentran metiladas.

OBJETIVO GENERAL

Estimar la asociación de la infección por VPH con la presencia de cáncer bucal, y determinar los patrones de metilación del VPH-16 en los casos de CB, analizando además otros factores de riesgo como el uso de tabaco y alcohol.

Objetivos particulares

- Estimar la asociación de la infección con VPH-AR con la presencia de CB.
- Estimar la asociación del tabaco y/o alcohol con la presencia de CB.
- Estimar la asociación de la infección con VPH-AR con los hábitos sexuales en los casos.
- Estimar los patrones de metilación de las posiciones 7049 a 115 del VPH-16

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño del estudio

Estudio prolectivo de casos y controles, pareado por edad y género, que se desarrolló en un período de tres años (de septiembre de 2003 a septiembre de 2006) con la participación del Departamento de Cabeza y Cuello y el Laboratorio de Virus y Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), el Departamento de Oftalmología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, y la Clínica Estomatológica “Dr. Rafael Lozano”, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. El diseño del presente estudio incluye las recomendaciones del grupo STROBE (2007).

6.2 Sujetos participantes

6.2.1 Casos

Criterios de inclusión. Individuos mayores de 18 años, con diagnóstico histológico reciente de CECB y sin tratamiento médico previo (cirugía, quimioterapia y/o radioterapia), que acudieron al departamento de Cabeza y Cuello del INCan para la atención de su enfermedad, en el periodo comprendido de septiembre de 2003 a diciembre de 2006. Para el propósito del presente estudio y teniendo como base la

Clasificación Internacional de Enfermedades, de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1992), el término cáncer bucal incluyó las zonas topográficas correspondientes a mucosa yugal, mucosa labial, piso de boca, dorso, bordes laterales y vientre de lengua, paladar duro y blando y proceso alveolar (ICD 10 C01–C06).

Criterios de exclusión. Individuos con diagnóstico previo de CECB, o que hubieran recibido quimio o radioterapia, así como cirugía como parte de su tratamiento. Individuos que decidieran no participar en el estudio, o con incapacidad física o mental para hacerlo. Individuos con cáncer en piel de labio, borde bermellón, área amigdalina, orofaringe y base de lengua, o en otras localizaciones fuera de las especificadas en el apartado anterior. Individuos con neoplasias de glándulas salivales, linfoma, melanoma o sarcoma.

6.2.2 Controles.

Criterios de inclusión. Sujetos mayores de 18 años, sin CECB. El pareamiento de los casos y controles se realizó de acuerdo a la edad (considerando ± 5 años) y género. Para cada caso se contempló la inclusión de cuatro controles, seleccionados de dos fuentes diferentes, que se encontraban en la misma área geográfica que el INCan, y que al igual que esta institución, atienden en general, a población no derechohabiente de la Ciudad de México, y con estratos socio-económicos similares:

- Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. Se solicitó la participación de los pacientes del Servicio de Oftalmología, que se encontraban como candidatos para cirugía de cataratas o que asistían a la consulta de glaucoma. Se seleccionó este servicio, debido a que es una de las áreas hospitalarias donde podemos encontrar a

individuos con edades similares a las de los casos, y que en general, no tienen afecciones sistémicas de importancia para la exposición en estudio (VPH).

- Clínica Estomatológica “Dr. Rafael Lozano” de la UAM-Xochimilco. Se incorporaron individuos que acudían a este lugar para solicitar atención dental, por problemas dentales no asociados con lesiones precancerosas o cancerosas de la mucosa bucal, o padecimientos sistémicos de importancia. En virtud de la diversidad de edades de los sujetos que acuden a la clínica, fue factible incluir aquellos que resultaron comparables en edad respecto a los casos. Al incorporar un segundo grupo control, con individuos que representan a la comunidad de una zona cercana al INCan, buscamos disminuir el sesgo de selección que supone el incluir controles hospitalarios.

Criterios de exclusión. Individuos con historia o presencia de lesiones pre-malignas o neoplasias, bucales y/o en otros sitios. Individuos con diagnóstico de enfermedades asociadas con la exposición de interés en el estudio. Individuos con incapacidad física o mental que impida su participación en el estudio. Individuos en los que no se obtenga consentimiento de participación.

6.3 Aspectos éticos

En ambos grupos, se le solicitó al participante que leyera la carta de consentimiento (Anexos 1a y 1b), se contestaron las dudas que tuviera respecto al estudio y se pidió que firmara la carta de consentimiento. Es importante destacar que se le hizo saber a todos los participantes que la negativa en relación a su participación en el estudio no tendría consecuencias negativas en la atención médica u odontológica que recibía en la institución a la que acudía para consulta.

6.4 Variables

Las variables a considerar fueron:

- Variable dependiente: cáncer bucal
- Variables independientes: ocupación, nivel socioeconómico, residencia, antecedentes familiares de neoplasias malignas, índice de higiene bucal, estadificación del paciente, hábitos sexuales, consumo de tabaco y alcohol, características clínicas y localización del CECB, presencia de VPH-AR, metilación en las islas CpG's del VPH-16.

6.4.1 Operacionalización de variables

- Áreas topográficas: La mucosa bucal a estudiar comprenderá mucosa yugal, mucosa labial, piso de boca, dorso, bordes laterales y vientre de lengua, paladar duro y blando y encía alveolar (Anexo 4).
- Consumo de tabaco: Los individuos incluidos en el estudio fueron clasificados como no fumadores, fumadores y ex fumadores. Los no fumadores fueron individuos que reportaron nunca haber fumado, o haber fumado menos de un cigarrillo al día durante toda su vida. Los fumadores fueron definidos como individuos que habían fumado al menos un cigarrillo al día durante el año previo a su inclusión en el estudio. Los ex-fumadores fueron aquellos individuos que habían dejado de fumar al menos 12 meses antes de su inclusión al estudio. Se interrogó a los fumadores y ex fumadores sobre la edad de inicio y de término del hábito tabáquico, y la cantidad de cigarros consumidos por día. La cantidad acumulativa de tabaco se calculó en paquetes-año (no. cigarros por día x 365.25 / 20 x años de consumo). La variable *Consumo acumulativo de tabaco* fue categorizada en tres categorías: 0, <25, y ≥ 25 paquetes-año.

- Consumo de alcohol: El consumo de bebidas alcohólicas fue calculado en unidades de bebida (UB), de acuerdo al tipo de bebida que sea consumida, y tomando en cuenta el contenido de etanol de cada una de ellas (SSA, ENA 2003):

vino	125 ml	tequila	30 ml
ron	30 ml	mezcal	30 ml
licor	30 ml	cerveza	330 ml
brandy	30 ml	pulque	330 ml

Los individuos incluidos en el estudio fueron clasificados como no bebedores, bebedores y ex bebedores. Los sujetos que habían bebido menos de una UB por semana, o que reportaron no haber bebido nunca fueron considerados no bebedores. Los bebedores fueron definidos como aquellos individuos que habían bebido al menos una UB por semana durante el año previo al estudio. Los ex-bebedores incluyeron a los individuos que habían dejado de consumir bebidas alcohólicas al menos un año antes de su inclusión en el estudio. Los bebedores y ex-bebedores fueron interrogados acerca de la edad en la que iniciaron y dejaron de consumir alcohol. Se calculó la cantidad acumulativa de UB en UB-año (Unidad de bebida semanal x 52 x años de consumo). La variable *Consumo acumulativo de alcohol* fue dividida en tres categorías: 0, <16, y ≥ 16 UD-año.

- Higiene bucal: Se cuantificó por medio del índice de higiene bucal simplificado (IHBS), examinando las superficies de los seis dientes que establece el índice (Green y Vermillon, 1967).

6.4.2 Cuestionarios

A cada individuo se le aplicó un cuestionario que incluía las variables consideradas de importancia para el estudio (edad, ocupación, estado civil, escolaridad, lugar de

residencia, antecedentes familiares de neoplasias malignas, consumo de tabaco y/o alcohol e higiene bucal) (Anexo 2).

Se entregó a cada individuo un sobre con un cuestionario para su llenado, con carácter confidencial, sobre hábitos sexuales (Anexo 3). Se recurrió a la versión en español del Cuestionario sobre Experiencias Sexuales (Cortina 2001) aplicado en Estados Unidos y validado en mujeres latinas con bajo grado de aculturación. Durante el estudio piloto, se aplicó el cuestionario a un grupo pequeño con el fin de explorar la claridad y comprensión de las preguntas y la duración del llenado del cuestionario. Se encontraron algunas dificultades de comprensión entre las mujeres, por lo que se modificaron las preguntas utilizando términos coloquiales, considerando las características culturales de los participantes. Las preguntas se redactaron de manera más directa, con uso de lenguaje sencillo y fueron ordenadas de los aspectos más generales a los más íntimos (Hidalgo-San Martín y col. 2003). Nuevamente se aplicó el cuestionario y se observó que las preguntas fueron comprendidas por los entrevistados.

6.5 Análisis estadístico.

Los datos de los cuestionarios fueron codificados antes de su captura en una base de datos en el programa EXCEL, misma que fue llevada al programa estadístico STATA v.8.0 (*Stata Corporation LP, College Station TX. USA*), para el análisis estadístico de los datos.

6.5.1 Cálculo del tamaño muestral.

Con el fin de obtener un poder de 80.03% a un nivel de significancia del 5%, se determinó incluir a un mínimo de 52 individuos con CECB (grupo de casos) y cuatro

controles por caso, es decir, 208 controles, utilizando un OR de 3 para la asociación entre VPH y CECB.

El tamaño de la muestra fue calculado de acuerdo a la fórmula para estudios de casos y controles pareados:

$$m = \frac{(Z(a)/2 + Z(b) \cdot P \cdot \sqrt{1 - P})^2}{(P - 1/2)^2} \quad M = \frac{m}{Pe} = 52$$

6.5.2 Análisis de los resultados

Se realizó la descripción de las variables a través de sus medidas de centralización y dispersión. Para el análisis univariado entre cáncer bucal y los factores de riesgo incluidos en el estudio, se calcularon las razones de momios (RM) y sus intervalos de confianza al 95% (IC 95%), a través de un modelo de regresión logística condicional. La categoría de variable independiente con un nivel mínimo de riesgo para cáncer bucal fue tomada como referencia. Un valor de p a dos colas menor de 0.05, se consideró significativo.

Con el fin de estimar las razones de momios y la independencia entre los efectos, se llevó a cabo la regresión logística multivariada utilizando funciones de la regresión logística condicional. Los criterios de selección de las variables que se incluyeron en el modelo se basaron además de su plausibilidad biológica, en la obtención de un valor de p menor de 0.20 en el análisis univariado. La selección de las variables consideró la estrategia de backward stepwise, con el fin de construir un modelo final con un nivel de significancia estadística ≥ 0.1 para su eliminación, y un nivel < 0.05 para su re-inclusión en el modelo.

Las interacciones entre la presencia de cáncer bucal y los factores de riesgo, fueron también analizadas a través de su incorporación en los modelos.

Las diferencias en las características demográficas y clínicas entre los casos positivos y negativos a VPH de alto riesgo (VPH-AR) fueron analizadas por medio de la pruebas Chi cuadrada y exacta de Fisher (para las variables categóricas) y U de Mann-Whitney (para variables dimensionales).

6.6 Procedimientos clínicos

En los individuos afectados con CECB se registraron las características clínicas (color, textura, apariencia, extensión, tamaño y localización del CECB), realizando la estadificación de acuerdo a criterios establecidos por el AJCC (1997). Se anotó también la sintomatología asociada al padecimiento, fecha de inicio y tiempo (en meses) transcurrido para la obtención del diagnóstico. En ambos grupos, se realizó un examen bucal minucioso y se calculó el índice de higiene bucal simplificado (Green y Vermillon, 1967).

A todos los participantes se les realizó un cepillado profundo de la mucosa bucal por medio de un cepillo citológico estéril de nylon. En los individuos con CECB el cepillado se tomó de la zona más representativa de la lesión, de donde posteriormente se realizó la toma de biopsia. En los controles el cepillado fue tomado de una zona topográfica equivalente a la del individuo afectado. En todos los pacientes, el cepillo se frotó 10 veces sobre la superficie indicada y se introdujo en un tubo con 8 ml de Precervcyt (*Cytec Corporation, USA*).

En el grupo de pacientes con CECB, se tomó una pequeña muestra del tejido afectado por medio de sacabocados desechables, que en todos los casos coincidió con la

biopsia que se realizaba rutinariamente para confirmar el diagnóstico de cáncer bucal en el lugar en el que el paciente fue diagnosticado. El tamaño y número de muestras dependió de cada caso en particular (una de 8 mm o dos de 4 mm).

El tejido obtenido fue dividido en dos partes, una sección fue utilizada para el estudio histopatológico (fijando con formalina al 10%) y teñida con hematoxilina y eosina. Las biopsias obtenidas fueron procesadas en el laboratorio de Histopatología del INCan y en el laboratorio de Histopatología de la UAM-X. Los estudios histopatológicos fueron llevados a cabo por un patólogo del Departamento de Patología General del INCan y por dos patólogos bucales de la UAM-X. La segunda sección de tejido se introdujo en Precervcyt y se almacenó en un ultracongelador Revco, a una temperatura de -70°C .

6.7 Procedimientos de laboratorio

6.7.1 Extracción y purificación del ADN

La extracción del ADN de las muestras se llevó a cabo por medio del Wizard Genomic ADN Purification kit (*Promega*).

Cepillado citológico: La muestra obtenida se colocó en el vórtex durante 10 segundos con el fin de separar el material obtenido de la superficie del cepillo, y extraer este último con la menor pérdida celular posible.

Como primer paso se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 16,000 rpm, se decantó el Precervcyt, y se dejaron destapados los tubos durante 12 horas para su correcto secado. Posteriormente, se llevaron a cabo los siguientes procedimientos:

- En un tubo eppendorf de 1.5 ml se colocó la pastilla obtenida y se le añadieron 300 μl de solución lítica nuclear, re-suspendiendo varias veces el contenido de tubo.

- Se añadió 17.5 µl de proteinasa-k (20 mg/ml) incubándose a 65°C en termoblock (3 hrs).
- Se llevó a temperatura ambiente. Se agregó 1.5 µl de solución RNAsa, incubando a 37° C durante 30 minutos.
- Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 200 µl de solución precipitadora de proteínas, se agitó en el vórtex y se colocó en hielo durante 5 minutos.
- Se centrifugó 4 minutos a 14 000 rpm. Se removió el sobrenadante y fue transferido a un tubo limpio de 1.5 ml al que se le agregaron previamente 300 µl de isopropanol. Se mezcló suavemente hasta que se vieran las cadenas de ADN.
- Se centrifugó 5 minutos a 14 000 rpm, y se retiró el sobrenadante.
- Se agregaron 300 µl de etanol al 70% y se invirtió varias veces el tubo para lavar el ADN, se centrifugó por 5 minutos.
- Se aspiró el etanol usando una pipeta de secuencia y se invirtieron los tubos destapados sobre una servilleta limpia hasta que se secaran por completo.
- Se añadieron 30 µl de solución rehidratante de ADN y se incubó a 65° C por una hora.
- Finalmente, el ADN obtenido fue almacenado a - 20° C en alícuotas de 5 µl.

Biopsia: Se tomó una porción de la muestra, con una hoja de bisturí diferente para cada muestra se cortó el tejido en pequeños fragmentos, los cuales fueron re-suspendidos en 300 µl de solución lítica celular y sometidos a licuefacción en un homogeneizador de tejidos, utilizando un tubo de transferencia. Se transfirió a un tubo eppendorff de 1.5 ml y se llevó a cabo el procedimiento descrito para el cepillado citológico. Las condiciones utilizadas en cada una de las reacciones de PCR se describen en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Condiciones utilizadas para los ensayos de PCR en cada par de oligonucleótidos.

GH20/PC04		MY09/MY11		GP5+/GP6+	
Buffer 10x	2.0 µl	Buffer 10x	2.0 µl	Buffer 10x	5.4 µl
MgCl ₂ (2.5 mM)	1.2 µl	MgCl ₂ (1.5 mM)	1.2 µl	MgCl ₂ (3.5 mM)	2.8 µl
MY09	0.2 µl	MY09	0.2 µl	GP5+	1.6 µl
MY11	0.2 µl	MY11	0.2 µl	GP6+	1.6 µl
dNTP	2.0 µl	dNTP	2.0 µl	dNTP	4.0 µl
Taq	0.2 µl	Taq	0.2 µl	Taq	0.4 µl
H ₂ O	14.2 µl	H ₂ O	14.2 µl	H ₂ O	4.2 µl

6.7.2 Amplificación del gen β -globina

Para comprobar que el material obtenido durante la extracción era adecuado para utilizarse en PCR, a todas las muestras se les amplificó un fragmento del gen β -globina, que es un gen altamente conservado en las células humanas. Para ello, se utilizó el siguiente par de oligonucleótidos, que amplifican un fragmento de aproximadamente 260-280 pb (Resnick y col. 1990):

GH20 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC - 3'

PC04 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC - 3'

6.7.3 Amplificación de la región L1 de Papilomavirus

Posteriormente, las muestras fueron amplificadas con los oligonucleótidos universales MY09/MY11, localizados dentro de la región L1 del genoma del VPH, que incluye los nucleótidos 6722 al 7170 del VPH-16, y las regiones correspondientes a otros tipos virales. Estos oligonucleótidos son capaces de detectar más de 25 tipos virales; dando un fragmento aproximado de 450 pb (Manos y col. 1989):

MY09 5'-CGT CCA AAA GGA AAC TGA GC -3'

MY11 5'-GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG -3'

Las muestras que resultaron negativas a la amplificación con MY09/MY11 fueron sometidas subsecuentemente a amplificación con los oligonucleótidos universales GP5+/GP6+, localizados dentro de la secuencia reconocida por los oligonucleótidos MY09/MY11. Dichos oligonucleótidos amplifican un fragmento de 150 pb, y pueden detectar los tipos virales 6, 11, 16, 18, 31, 33 y 32 (De Roda y col. 1995).

GP5+ 5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3'

Gp6+ 5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3'

Adicionalmente, las muestras fueron sometidas a amplificación del gen E6 del VPH-16, por medio de oligonucleótidos específicos para la identificación este gen (F048/R551), en un volumen final de 20 µl, consistentes en 3 µl de ADN muestral (100 ng), 2.5 µl de buffer 10x, 0.5 µl de Taq polimerasa, 10 pmol de cada primer, y 0.2 mM de dNTPs. La concentración de MgCl₂ usada fue de 2mM (2.5 µl).

Las condiciones para la realización de cada una de las reacciones de PCR fueron las siguientes: pre-calentamiento por 5 min a 94 °C, seguido por 40 ciclos de 20 seg. a 94 °C, 20 seg. a 39 °C (GP5+/GP6+) o 55°C (MY09/MY11; GH20/PC04) y 40 seg. a 72 °C, y una extensión final de 5 min a 72 °C. La reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 20 µl, que incluyeron 3 µl de ADN extraído como templado (100 ng), 2 µl de buffer 10x, 1 U de Taq polimerasa (*Applied Biosystems*), 10 pmol de cada primer, y 0.2 mM de dNTPs. Las condiciones de MgCl₂ fueron descritas previamente.

En cada una de las reacciones de PCR mencionadas, se incluyeron de manera sistemática dos tipos de controles:

- positivo (ADN de líneas celulares HeLa y CaSki)
- negativo (tubo de mezcla de reacción con agua)

Las muestras fueron sometidas a amplificación aleatoriamente, y de forma ciega a las características de las muestras que pudieran incorporar sesgos de susceptibilidad diagnóstica (si eran casos o controles, datos demográficos o clínicos relevantes, etc.). Las muestras de los controles fueron preparadas y analizadas de forma paralela a la de los casos, con el fin de asegurar que las condiciones de reacción fueran iguales. Se procuraron también precauciones universales para los procedimientos de PCR, como el hecho de que la preparación de las mezclas, la amplificación y la electroforesis fueron realizadas en cuartos diferentes.

6.7.4 Reacción de secuenciación

Los productos de PCR que resultaron positivos fueron secuenciados en un termociclador programable (Mastercycler® gradient, Eppendorf) usando el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (*Applied Biosystems*), usando uno de los oligonucleótidos del PCR (GP5+ and MY09). La mezcla de reacción y las condiciones del ciclo fueron llevadas a cabo según las recomendaciones del fabricante. El análisis de las secuencias fue realizado por medio del ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer System (*Applied-Biosystems*). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las base de datos de GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) por medio del programa BLAST (Altschul y col. 1997).

6.7.5 Análisis de los patrones de metilación en la región LCR de VPH-16

6.7.5.1 Modificación del ADN con bisulfito de sodio y PCR

Con el fin de identificar los residuos de citosina metilados en las muestras positivas a VPH-16, el ADN obtenido se modificó con bisulfito de sodio, a través del kit EZ ADN Methylation (*Zymo Research*), de acuerdo a los siguientes procedimientos.

Se adicionaron 5 µl de buffer de dilución-M a la muestra de ADN ajustando a un volumen total de 50 µl con agua estéril. Se incubó la muestra a 37 °C por 15 minutos. Posteriormente, se añadieron 100 µl de Reactivo de Conversión CT y se agitó. Se incubó en condiciones de oscuridad a 53 °C de 12-16 hs, para posteriormente introducir la muestra en hielo por 10 minutos.

Para desulfonar la muestra, se utilizó una columna de desulfonación, lo cual minimiza la pérdida de ADN durante el tratamiento de limpieza. Se adicionaron 400 µl de buffer de unión M a la muestra y se pasó la muestra a una columna soportada por un tubo colector de 2 ml. Se centrifugó por 30 segundos a 14 000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 200 µl de etanol absoluto a la columna y se incubó y centrifugó la muestra durante 30 segundos. Se añadieron 200 µl de buffer de desulfonación M y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente para posteriormente centrifugar por 30 segundos. Se incorporó a la columna 200 µl de etanol absoluto y se centrifugó durante 30 segundos, repitiendo este último paso. Finalmente, se adicionaron 30-50 µl de buffer de elusión, se centrifugó y el sobrenadante que se obtuvo fue el ADN listo para ser amplificado por PRC.

Se analizaron las posiciones genómicas 7049 a 115, que incluyen la parte 3' de L1, la región Larga de Control, el enhancer y el promotor. En estas regiones se encuentran presentes 19 islas CpGs, 3 provenientes de la parte final de 3' de L1 (7091, 7136 y 7145), 5 del segmento 5' de la LCR (7270 a 7461), 5 del enhancer (7535 a 7695), una del origen de replicación del virus (7862) y 5 del promotor E6 (31 a 58).

Para la amplificación del ADN modificado, se utilizaron tres pares de oligonucleótidos (Figura 4), diseñados de acuerdo a la secuencia del genoma de HPV-16, asumiendo que todos los residuos de citosina fueron convertidos a uracilo. La modificación con bisulfito introduce muescas en el ADN, y como consecuencia, es imposible amplificar eficientemente segmentos genómicos que excedan de 100 pares de bases. Debido a esta limitante, se seccionaron los 913 pares de bases en 3 amplicones con que terminaban en las posiciones genómicas 7091 a 7461, 7535 a 7695 y 7862 a 58.

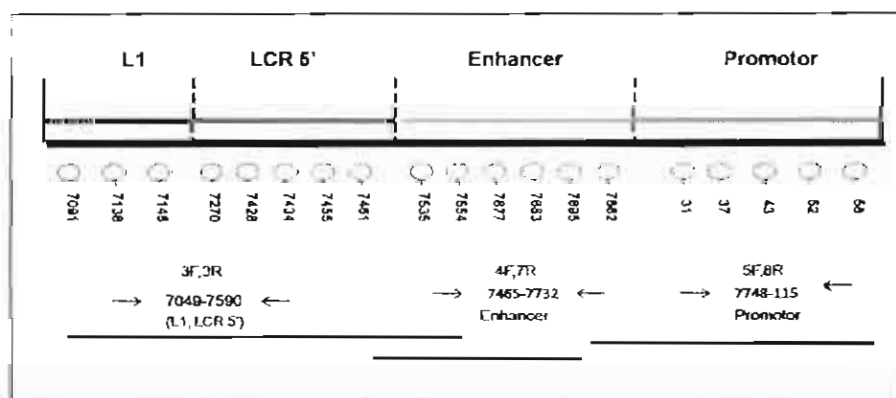


Figura 4. Islas CpGs presentes en las regiones analizadas. Se muestran las 19 islas encontradas en cada región: 3 en L1, 5 en LCR 5', 6 en el enhancer, y 5 en el promotor.

Para la amplificación de parte del gen L1 y la región 5' se utilizaron los primers:

16msp3F (7049-7078): AAGTAGGATTGAAGGTAAATTAAAATTTA)

16msp3r (7590-7560): AACAAACAATACAAATCAAAAAACAAAAA);

El enhancer fue amplificado con los oligonucleótidos:

16msp4F (7465-7493): TATGTTTTTTGGTATAAAATGTGTTTTT

16msp7R (7732-7703): TAAATTAATTAAAACAAACCAAAAATATAT

Para amplificar el promotor se utilizaron los primers:

16msp5F (7748-7777): TAAGGTTTAAATTTTAAAGGTTAATTAAAT

16msp8R (115-86): ATCCTAAAACATTACAATTCTCTTTTAATA.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l, la cual contenía 2.5 μ l de buffer IX de Taq Gold, 4 μ l (0.2 mM) de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 2.5 μ l de cada uno de los oligonucleótidos (1pMol/ μ l), 2.5 μ l de MgCl (25 mM), 0.2 μ l (1U) de Ampli Taq Gold (*Applied Biosystems*), 5.8 μ l de H₂O y 5 μ l del ADN modificado. La reacción de PCR fue programada de la siguiente manera: 9 minutos a 94 °C, seguido por 44 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 53 °C por 30 segundos y extensión a 68 °C por 45 segundos. Con extensión final a 68 °C por 7 minutos. Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 2% por medio de electroforesis.

6.7.5.2 Clonación y transformación del ADN-VPH modificado

El kit TOPO TA Cloning (*Invitrogen, Co.*) permite la clonación en un solo paso, el vector (pCR4-topo) está linearizado y posee extremos cohesivos. En el extremo 3' sobresale

una T la cual tiene una topoisomerasa unida covalentemente. Por otro lado, la Taq Gold deja al producto de PCR también con los extremos cohesivos, una A en el extremo 3'. Estas características permiten la inserción del producto de PCR en forma eficiente al vector (Fig. 5). La clonación del producto de PCR dentro del vector se llevó a cabo a través del siguiente procedimiento: a un tubo de 1.5 µl se le añadieron 2 µl de agua estéril, 1 µl de sal (1.2 M NaCl y 0.06 M MgCl₂), 1 µl de vector TOPO y 2 µl de producto de PCR. Se mezcló la reacción y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos.

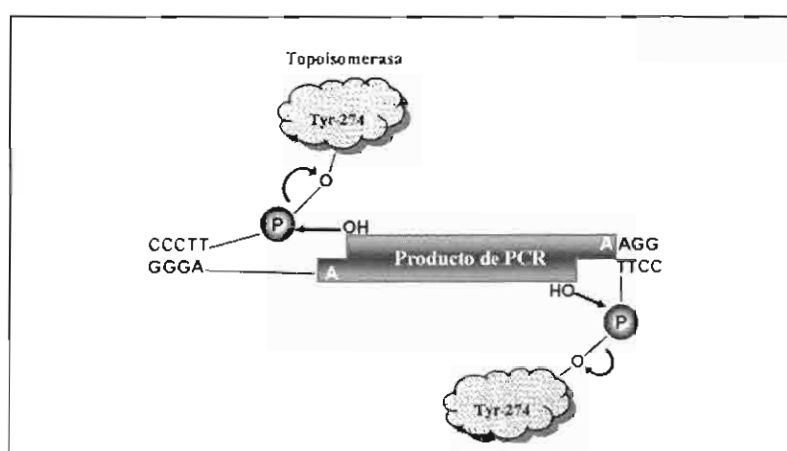


Figura 5. Vector topo con extremos cohesivos (T en el extremo 3') y el producto de PCR con extremos cohesivos (A en el extremo 3'). La topoisomerasa unida covalentemente al vector cataliza la ligación y asegura la clonación del producto de PCR dentro del vector (Adaptado de: TOPO TA cloning kit, *Invitrogen, Co*).

Se alicuotaron 25 µl. de células TOPO en un tubo de 1.5 ml y se transfirieron 4 µl de la mezcla del vector más el producto de PCR. Se introduce la reacción en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se somete a las bacterias a choque térmico, para lo cual, se transfirió a baño María durante 30 segundos. Se colocaron en hielo durante dos minutos más, y se adicionaron 100 µl. de medio SOC a cada tubo. Posteriormente, se incubaron a

37°C por 60 minutos a 275 rpm. Las bacterias fueron plaqueadas en medio LB y kanamicina, y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Posteriormente, se realizó PCR de colonia a cada una de las colonias empleando el siguiente protocolo: 2.5 µl. de buffer 10x, 4 µl. de dinucleotidos (dNTPs) 1.25 mM, 2 µl. de MgCl₂ 25 mM, 1 µl. del primer M13F, 1 µl. del primer M13R, 14.1 µl. de H₂O y .2 µl. de Taq polimerasa. La reacción de PCR fue programada de la siguiente manera: 7 minutos a 94 °C, seguido por 30 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 60 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 1 minuto). Con extensión final a 72 °C por 7 minutos. La presencia de los productos de PCR fue verificada en gel de agarosa al 1% por electroforesis teñido con bromuro de etidio (10 mg/mL). Con el fin de limpiar los productos de PCR, se colocaron en un tubo 9.5 µl de PCR-ADN (80-200 ng), 1 µl 10X SAP, 1 µl SAP, 0.5 µl. exonucleasa 1. Se incubó durante 60 min a 37°C y posteriormente se volvió a incubar por 30 minutos a 72°C en baño maría. Por último, se enfrió la muestra a 4 °C y fue almacenada a -20 °C.

6.7.5.3 Secuenciación del ADN

Con el fin de llevar a cabo la reacción de secuenciación, se colocaron en un tubo de 0.2 ml: 2.5 µl de *Exo-sap* ADN, 2 µl de primer M13R (1.6 pMol), 2 µl de agua, 2 µl 5X buffer y 1.5 µl de *Big Dye Terminator Mix* V3.1. Se programó la reacción de secuencia de la siguiente manera: 3 minutos a 94 °C, seguido por 24 ciclos de amplificación (desnaturalización a 96 °C por 30 segundos, alineamiento a 50 °C por 15 segundos y extensión a 60 °C por 4 minutos. Se enfrió a 4 °C y se almacenó a -20 °C. A cada uno de los tubos de la reacción de secuencia se adicionaron: 3 µl de acetato de sodio 3M pH 4.6, 32.5

μl de etanol al 95% y 14.5 μl de agua destilada. Se agitó en el vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se centrifugó por 20 minutos a 14 000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla obtenida fue lavada con etanol al 70%, se centrifugó nuevamente a 14 000 rpm por 5 minutos. Por decantación, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar, para posteriormente resuspender en 30 μl de formamida Hi-Di. Se desnaturalizó el ADN a 96 °C por 2 minutos, e inmediatamente se colocaron los tubos en hielo y se envió a secuenciación.

RESULTADOS

Durante el periodo de inclusión en el estudio (tres años), se incorporaron 62 casos y 248 controles (53.2% hombres) al estudio, con una mediana de edad de 62 (Q_1 - Q_3 , 54-72) años.

7.1 Estandarización de los ensayos de laboratorio.

La extracción de ADN de cada una de las muestras (biopsias y cepillado citológico) fue llevada a cabo bajo las recomendaciones del fabricante. No fue necesario ajustar ningún procedimiento al método sugerido. Se obtuvo el ADN de la totalidad de las muestras: 62 biopsias de casos y sus correspondientes 124 cepillados citológicos, y 594 cepillados citológicos en controles (2 a 3 cepillados por control). Las muestras obtenidas fueron sometidas a cuantificación por medio de espectrofotometría, dividiendo el material en alícuotas de 50 μ l. El material resultante fue almacenado a -20 C.

7.1.1. Curvas de sensibilidad de ADN

Con el fin de lograr la óptima amplificación de las muestras, se realizaron curvas de sensibilidad para determinar la cantidad mínima de ADN requerida para las reacciones de PCR. A través de ADN extraído de células HeLa, y de ADN de biopsias y cepillados, se realizaron reacciones de PCR con diferentes concentraciones de ADN, tanto para MY09/11 como para β -globina (Figura 6). Se logró amplificar ADN de 20,000 células HeLa con MY09/11, y de 100,000 células HeLa con β -globina. Por otro lado, pudimos determinar que con 5 μ l. de ADN (100 ng/ μ l.) se obtenía la óptima amplificación de los productos, tanto en biopsia como en cepillado.



Figura 6. Curvas de sensibilidad de ADN. Se muestra el grado de amplificación obtenido con diferentes concentraciones de ADN: MP= Marcador de peso, 1) HeLa 1×10^6 , MY09/11, 2) HeLa 1×10^6 , β -globina, 3) HeLa 2×10^6 , MY09/11, 4) HeLa 2×10^6 , β -globina, 5) HeLa 1×10^5 , MY09/11, 6) HeLa 1×10^5 , β -globina, 7) HeLa 100,000 MY09/11, 8) HeLa 100,000 β -globina, 9) HeLa 20,000 MY09/11, 10) HeLa 20,000 β -globina.

7.1.2 Curvas de sensibilidad de $MgCl_2$

Adicionalmente, utilizando ADN extraído de la línea celular HeLa, se realizaron curvas de sensibilidad para la detección de la concentración óptima de $MgCl_2$ a utilizar en cada juego de oligonucleótidos (Figura 7). En el primer juego de oligonucleótidos (MY09/11), la amplificación óptima se obtuvo a una concentración de 1.5; para la amplificación del gen β -globina, la concentración ideal se identificó a una concentración de 2.5 mM, y finalmente para amplificar GP5+/6+, la concentración adecuada fue de 3.5 mM.

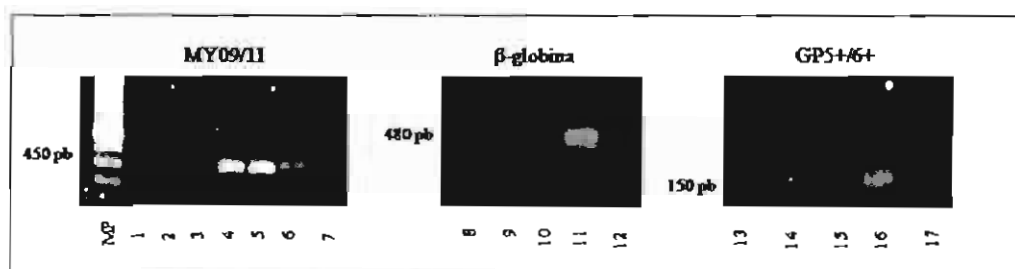


Figura 7. Curvas de sensibilidad de $MgCl_2$. Se observa la amplificación obtenida con diferentes concentraciones de $MgCl_2$ en tres juegos de oligonucleótidos, MY09/11: 1) 0.5, 2) 1.0, 3) 1.3, 4) 1.5, 5) 2.0, 6) 2.5, 7) H_2O ; β -globina: 8) 1.0, 9) 1.5, 10) 2.0, 11) 2.5, 12) H_2O ; y GP5+/6+: 13) 2.0; 14) 2.5; 15) 3.0, 16) 3.5, 17) H_2O .

7.2 Amplificación del gen β -globina

Todos los fragmentos de biopsias resultaron positivos en la reacción de PCR para β -globina (Figura 8); sin embargo, en 12 cepillados de los casos, no se pudo amplificar el gen, por lo que se recurrió a la amplificación del segundo cepillado citológico, resultando positivas en esa ocasión. En relación a los cepillados de los controles, en el primer cepillado resultaron positivas 174 muestras (70.2%); en el segundo cepillado, de las 74 muestras analizadas, 67 amplificaron el gen (90.5%). Las siete muestras restantes, fueron sometidas a amplificación con el tercer cepillado, de las cuales dos no amplificaron. Estas dos muestras fueron excluidas del estudio y se incorporaron dos muestras adicionales, que amplificaron el gen β -globina en el primer cepillado.

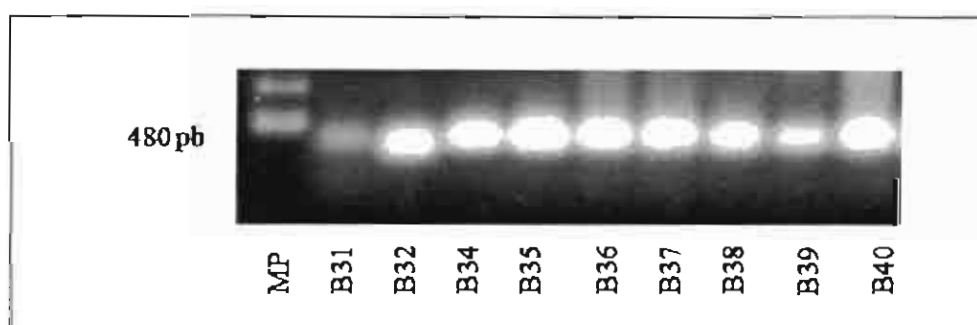


Figura 8. Amplificados del gen β -globina. Amplificados de los productos de PCR de ADN de las muestras con los oligonucleótidos GH20/PC04.

7.3 Amplificación del ADN-VPH

El siguiente paso fue la identificación del ADN de VPH en las muestras, para lo cual se utilizó en principio MY09/11, un par de oligonucleótidos degenerados capaces de identificar la mayoría de los genotipos de VPH (Franceschi y col, 1996) (Figura 9). Por medio de este ensayo, pudimos identificar 11 muestras positivas en los casos (34.4%), y 23 en los controles (41.8%) (Cuadro 3).

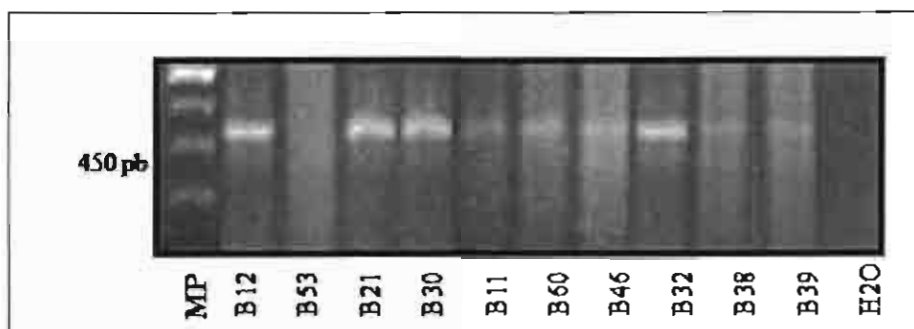


Figura 9. Amplificados de MY09/MY11. Amplificados de los productos de PCR en el ADN del VPH de las muestras con los oligonucleótidos MY09/11.

A través de la amplificación de un fragmento de 150 pb con los oligonucleótidos GP5+/6+, se pudieron identificar 30 muestras positivas a VPH adicionales que no habían amplificado el ADN viral con los oligonucleótidos MY09/11 (Figura 10). Sin embargo, dado que las muestras que habían amplificado ADN-VPH con el uso de MY09/11 también resultaron positivas con el uso de GP5+/6+, la proporción real de muestras que amplificó este juego de oligonucleótidos es mayor (22/32, 68.7%) que la obtenida con MY09/11 (11/32, 34.4%).

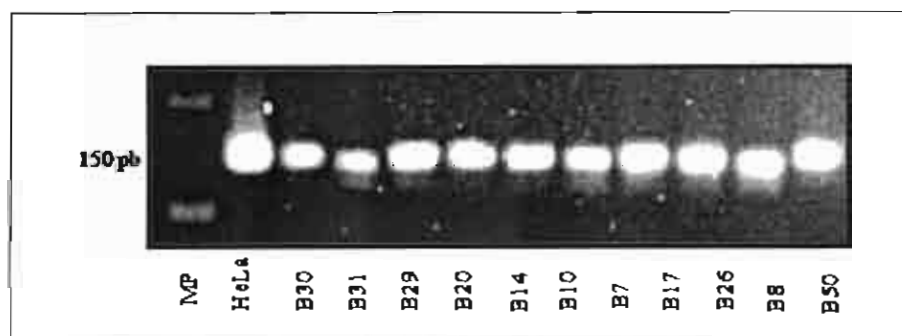


Figura 10. Amplificados de GP5+/GP6+. Amplificados de los productos de PCR en el ADN del VPH de las muestras con los oligonucleótidos GP5+/GP6+.

Adicionalmente, con el fin de identificar de manera específica aquellas muestras positivas a VPH-16, el ADN que dio un resultado positivo en los ensayos anteriormente descritos, fue sometido a amplificación del gen E6 de VPH-16, que amplifica un fragmento de 500 pb (Figura 11).

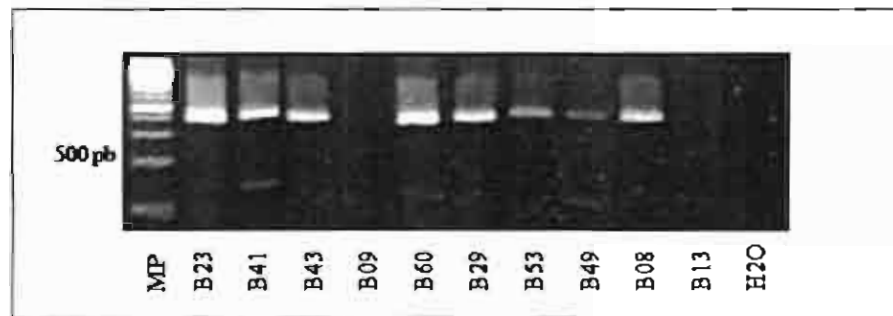


Figura 11. Amplificados de E6-VPH-16. Amplificados de los productos de PCR en el ADN del VPH de las muestras positivas previamente a MY09/11+ o GP5+/6+.

Los productos de PCR positivos a MY09/11 y/o GP5+/6+ fueron sometidos a purificación, y posteriormente a secuenciación directa y comparación de la secuencia obtenida por medio del programa BLAST. Se obtuvieron secuencias en 70 muestras, los diferentes tipos virales encontrados para casos y controles se observan en el Cuadro 4.

7.4 Factores de riesgo para el cáncer bucal

Las asociaciones descritas en el presente trabajo fueron obtenidas a partir del análisis de las variables de interés entre casos y los dos grupos de controles como un solo grupo, debido a que, una vez analizados por separado, los dos grupos de controles (LDC Tepepan y Hospital General “Dr. Manuel Gea González”) no presentaron diferencias significativas entre sí que ameritara el análisis individual de los grupos.

7.4.1 Características demográficas y clínicas

Las características demográficas de los casos y los controles incluidos en el estudio se muestran en el Cuadro 5. Como resultado del pareamiento, no se observaron diferencias en el género y la edad de los grupos. El estado civil, nivel educativo y la ocupación fueron similares en casos y controles ($p=0.576$, $p=0.307$, y $p=0.070$, respectivamente). El sitio más afectado por CECB fue la lengua (33 casos, 53.2%), seguida por la encía (12 casos, 19.4%) y el piso de la boca (10 casos, 16.1%). Siete casos de CECB en paladar y mucosa bucal representaron el 11.3% de los casos.

7.4.2 Consumo de tabaco y alcohol

El Cuadro 6 muestra los patrones de consumo de tabaco y alcohol en los casos y los controles. La mayor proporción de individuos fumadores y bebedores se encontró en el grupo de casos. La mediana de edad de inicio del consumo de tabaco fue similar tanto en casos como en controles. Asimismo, la mediana del periodo de tiempo sin consumo de tabaco que refirieron los ex fumadores fue muy semejante en ambos grupos (13 [Q₁-Q₃, 9 - 21] años vs. 12 [Q₁-Q₃, 6 - 21] años, $p<0.769$); sin embargo, la mediana de tiempo sin

consumo de alcohol en los ex bebedores fue mayor en los controles que en los casos (15 [Q₁-Q₃, 9 - 17] años vs. 9 [Q₁-Q₃, 2 - 18] años, $p<0.658$).

De los 62 casos, 25 (40.3%) presentaron consumo de tabaco y 17 (27.4%) de alcohol; en solo quince (24.2%) se encontró exposición simultánea a tabaco y alcohol. Doscientos tres individuos (65.5%) de los 310 participantes no tuvieron historia de consumo de ninguno de estos dos factores de riesgo (24 casos [38.7%] y 179 [72.2%] controles).

7.4.3 Asociación del VPH con el cáncer bucal

En el Cuadro 7 se observan las asociaciones encontradas a través de razones de momios crudas entre el cáncer bucal y la infección por VPH (RM= 3.41), y VPH-AR (RM= 6.21). En contraste, la presencia de VPH de bajo riesgo no se asoció con el cáncer bucal (RM= 0.83, $p=0.747$).

En el presente estudio, se encontraron cinco tipos de VPH-AR, cuatro de los cuales fueron más frecuentes en casos que en controles: VPH-16 (55.6% vs. 34.9%), VPH-18 (18.5% vs. 11.6%), VPH-33 (7.4% vs. 2.3%) y VPH-35 (3.7% vs. 0%). Dos tipos de VPH-AR fueron identificados en controles y no en casos, VPH-31 (4.7%) y VPH-52 (2.3%).

En contraste, la frecuencia de tipos de VPH de bajo riesgo fue menor en casos que en controles (VPH-1 [3.7% vs. 16.3%], VPH-2 [3.7% vs. 7.0%], VPH-6 [0% vs. 9.3%], y VPH-13 [3.7% vs. 9.3%], con excepción de VPH-32, que fue más frecuentemente encontrado en casos (3.7%) que en controles (2.3%).

Las razones de momios e intervalos de confianza al 95% para aquellas variables clínicas que mostraron asociación significativa se observan en el Cuadro 8. La historia familiar de cáncer, positiva en 20 casos (32.3%) y 24 controles (9.7%), resultó ser un factor asociado con la presencia de cáncer bucal (RM= 4.16, IC 95%= 2.1 - 8.1, $p<0.000$). Las RM crudas para CECB en consumidores de tabaco y alcohol resultaron altas (7.8 y 6.3, respectivamente); adicionalmente, un riesgo incrementado se encontró al analizar el consumo de tabaco y alcohol. Los individuos con alto consumo de tabaco (≥ 25 paquetes-año) tuvieron un riesgo 27 veces mayor de presentar cáncer bucal; y los individuos con alto consumo de alcohol (≥ 16 unidades de bebida-año) tuvieron razones de momios más altas (RM= 38.5).

7.4.4 Análisis multivariado

El análisis de regresión logística condicional mostró que la historia familiar de cáncer, el VPH y el consumo de tabaco y de alcohol son factores asociados con el CECB (Cuadro 9). El consumo de tabaco y alcohol mostró una interacción significativa, lo cual indica que el efecto del tabaco y alcohol difiere según el nivel de exposición.

El Cuadro 9 muestra las RM reportadas por estrato; para el consumo de alcohol, se obtuvieron distintas razones de momios, para el estrato de no fumadores se observó una RM de 3.19, comparado con la RM= 28.44 en el estrato de fumadores de <25 paquetes-año. Por otro lado, la infección por VPH-AR se observó asociada de manera independiente con el riesgo de cáncer bucal (6 veces).

La presencia de tabaco y/o alcohol y/o VPH-AR fue identificada en 52 (83.9%) de los casos. En contraste, diez de los 62 casos de CECB (16.1%) negaron consumo de tabaco y

alcohol, y no resultaron positivos a VPH-AR en la mucosa bucal, la edad mediana de estos individuos fue 67.5 (Q_1 - Q_3 , 37 - 67) años, 60% correspondían al sexo femenino.

7.4.5 Características clínicas de los casos con y sin VPH

Cuarenta y seis casos (74.2%) se encontraban en estadios avanzados de la enfermedad (III y IV) y 16 (25.8%) presentaron carcinomas bien diferenciados. Cuando los casos fueron analizados de acuerdo a la positividad al VPH-AR, no se encontraron diferencias significativas en relación al género, la edad, el estadio clínico, el sitio anatómico en el que se presentó la lesión, y la historia familiar de cáncer.

La mayor proporción de carcinomas moderadamente/mal diferenciados se encontró en los casos positivos a VPH (13/23, 56.5%), en contraste con los VPH negativos (14/39, 35.9%); aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.261$).

El uso de tabaco fue mayor entre los casos que no tenían VPH-AR, aunque la diferencia no fue significativa (48.7% vs 26.1%, $p=0.110$); de manera similar, 14 de los 39 casos que eran negativos a VPH-AR eran bebedores (35.9%), en contraste con 3 de los 23 (13.0%) casos positivos ($p=0.077$). En 13 de los 23 casos positivos a VPH-AR (56%) no se registró consumo de tabaco o alcohol.

La mediana del periodo de tiempo previo al diagnóstico de CECB fue similar entre los casos negativos y los positivos a VPH-AR [Q_1 - $Q_3=3$ -7] meses vs. 7 [Q_1 - $Q_3=5$ -12 meses], $p=0.072$). Quince de los 23 casos VPH-AR+ reportaron dolor de moderado a severo (65.2%), mientras que 21 de los 29 casos negativos (53.8%) eran asintomáticos o

presentaban dolor ligero ($p=0.146$).

La comparación de los hábitos sexuales entre los casos de acuerdo a VPH-AR se muestra en el Cuadro 10. Las únicas dos variables que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los casos de CB positivos y negativos a VPH-AR, fueron la edad de inicio de vida sexual activa (VSA) y el número de parejas sexuales totales ($p=0.019$ y $p=0.033$, respectivamente).

7.5 Metilación de VPH-16

En el presente estudio, el tipo viral más frecuentemente encontrado en los casos fue VPH-16, encontrándose un total de 15 muestras positivas (24.2%), por lo que el estudio de los patrones de metilación viral fue realizado en estas muestras.

El ADN de las 15 muestras positivas a VPH-16 fue sometido a modificación por medio de bisulfito de sodio, que convierte citosinas en uracilos, sin afectar las metil-citosinas. La subsecuente amplificación por PCR convierte las metil-citosinas en citosinas, y los uracilos en timinas. Los amplicones fueron clonados en plásmidos de *E.coli* y las clonas individuales fueron posteriormente secuenciadas (Figura 12).

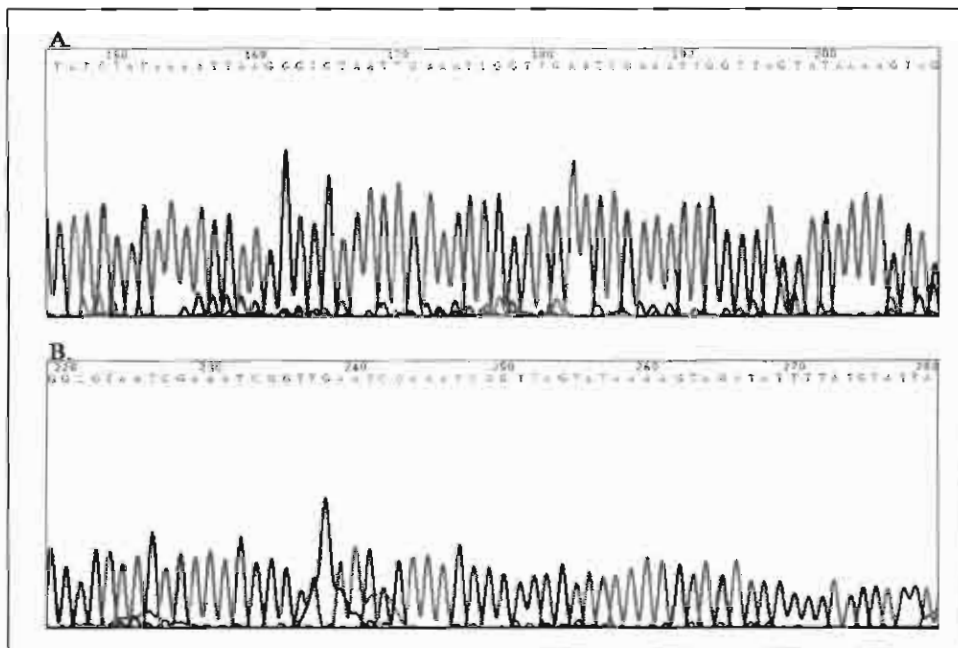


Figura 12. Cromatogramas de secuencias de la región promotora. En A, se observa la secuencia de la región promotora con islas CpGs sin metilación, en las que las citosinas fueron cambiadas por uracilo, y posteriormente por timinas. En B, se observa el promotor con islas CpGs metiladas que conservaron sus citosinas al no ser modificadas con bisulfito.

En doce de las quince muestras (80%) se obtuvo suficiente ADN para el análisis de metilación, proveniente de cuatro diferentes sitios de la boca: 7 de lengua (58.3%), 3 de encía (25%), una de paladar (8.3%) y una más de piso de boca (8.3%). Las características demográficas y clínicas de los 12 pacientes se muestran en el Cuadro 11. Se incluyeron muestras de 6 hombres (50%) y 6 mujeres (50%), con una mediana de edad de 56.5 (Q_1 - Q_3 , 52-65) años. No se encontró diferencia significativa en la edad respecto al género ($p=0.818$).

El consumo de tabaco se presentó en 5 (41.7%) pacientes, y el de alcohol en 2 (16.7%); en 7 individuos (58.3%) no se registró la presencia de ninguno de los dos hábitos. Ocho de los doce individuos (66.7%) presentaron lesiones bien diferenciadas y cuatro (33.3%) moderadamente diferenciadas. Diez (83.3%) de los pacientes se encontraban en estadios avanzados de la enfermedad (III y IV) y solo dos (16.7%) se presentaron en el estadio I.

Se obtuvieron diez clonas de cada biopsia. Los resultados individuales de los patrones de metilación en cada una de las clonas de las biopsias analizadas, por región, se muestran en la Figura 13. Cada amplicón es una línea de segmentos horizontales, los tres amplicones se encuentran separados por dos barras verticales de color blanco. Se pueden identificar los doce carcinomas analizados (B1 – B12), separadas en el interior por diez rectángulos, que representan las clonas obtenidas en cada muestra.

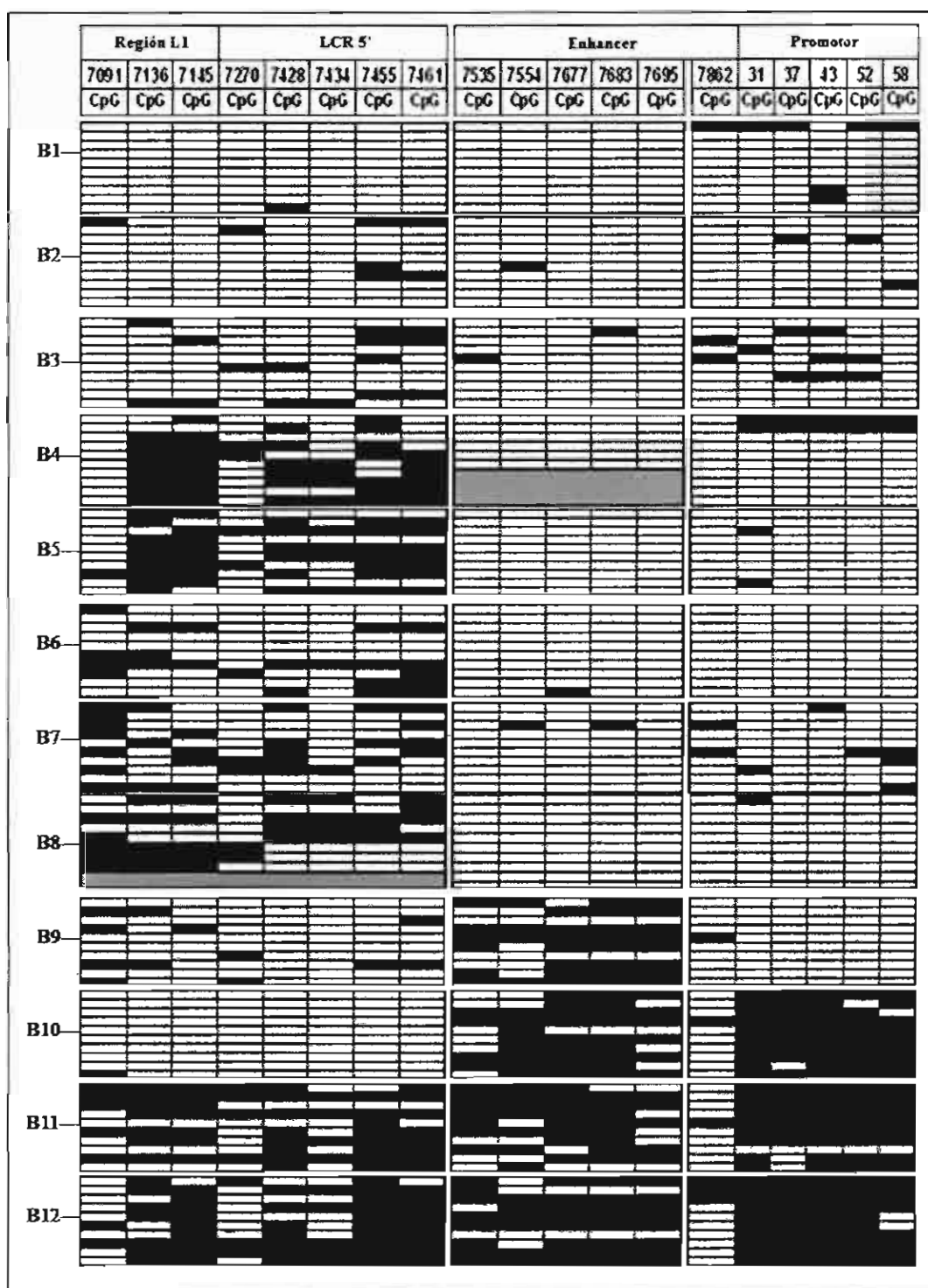


Figura 13. Metilación de islas CpGs en el VPH-16 proveniente de biopsias de cáncer bucal. Se observan las 19 islas incluidas en los tres segmentos analizados en 10 clonas independientes derivadas de 12 muestras de cáncer bucal, lo cual resulta en 2,244 dinucleótidos CpGs analizados.

Los rectángulos blancos representan islas CpGs desmetiladas, y los negros, aquellas en las que se encontró metilación. Las dos áreas grises observadas indican falta de información, debido a que no fue posible generar un mayor número de clonas en esas muestras por falta de material genómico. En total, en el presente estudio se reporta el estado de metilación de 2244 dinucleótidos CpG en 354 amplicones. El promedio total de metilación encontrado fue de 29.5% (Q_1 - Q_3 , 14.4-37.8).

7.5.1 Metilación en el gen L1 y región 5' de la LCR de VPH-16

Este amplicón incluyó 8 islas CpGs, tres en el gen L1 y cinco en la región 5' de la LCR. En las 12 muestras analizadas, el promedio de metilación en las tres islas del gen L1 fue de 35%. Las muestras B4, B5, B11 y B12 mostraron las proporciones más altas de metilación en este segmento (50, 55, 58 y 65%, respectivamente), en contraste con dos muestras que se encontraron prácticamente desmetiladas (B1 y B10).

Las cinco islas CpG correspondientes al segmento LCR 5' mostraron un promedio de metilación de 32%, las posiciones en las que se identificó la mayor proporción del evento fueron 7455 y 7461, principalmente en las muestras B4 (50%), B5 (52%), B11 (68%) y B12 (68%). De manera similar a lo observado en el segmento L1, las muestras B1 y B10 se encontraron libres de metilación.

7.5.2 Metilación del enhancer y el promotor de VPH-16

El amplicón central analizado contiene 5 islas CpGs, entre las posiciones 7535 y 7695, sobreponiéndose al enhancer transcripcional. El promedio de metilación en este segmento fue de 22.1%. En esta región, solo cuatro muestras presentaron hipermetilación,

B9 (57%), B10 (62%), B11 (60%) y B12 (68%); en contraste, la metilación encontrada en las ocho muestras restantes fue muy reducida, variando de 1.7 a 6.7%.

El amplicón 3' contiene 6 islas CpGs entre las posiciones genómicas 7862 y 58; en general, observamos un promedio de metilación de 28.8% en este segmento. En 9 de las 12 muestras no se observó metilación o se encontraron hipometiladas (del 2% al 20% de metilación).

Sin embargo, en tres muestras (B10, B11 y B12) se identificaron las frecuencias más altas de metilación de todos los segmentos analizados (94%, 86% y 96%). Es importante destacar que la posición 7862, parte del origen de replicación del virus, se encontró casi totalmente desmetilada en la mayoría de las muestras, con una frecuencia total de metilación del 9.2%.

7.6 Asociación entre metilación y características clínicas.

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la metilación y el género, la edad, la localización y el estadio clínico de la lesión, probablemente por el reducido número de muestras incluidas en este análisis.

Respecto al consumo de tabaco y alcohol, en 5 individuos con exposición a uno de ellos o a ambos presentaron una frecuencia de metilación en el enhancer menor al 50%, en contraste con quienes no tenían historia de su uso, en cuyo caso la proporción de metilación no mostró una tendencia ($p=0.038$). En el promotor, de manera similar a lo observado en el enhancer, los individuos con antecedentes de uso de tabaco y/o alcohol presentaron menores

frecuencias de metilación, en contraste con los sujetos sin estos hábitos, sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.091$).

Por otro lado, siete (87.5%) de los 8 individuos con <50% metilación presentaron tumores bien diferenciados, en contraste con 1 (25%) de los 4 que tuvieron > 50% de metilación en la LCR 5' ($p=0.030$).

Cuadro 3. Proporción de positividad para cada juego de oligonucleótidos, en 32 casos y 55 controles positivos a VPH.

Oligonucleótidos	Casos		Controles	
	n	(%)	n	(%)
MY09/MY11	11	(34.4)	23	(41.8)
GP5+/GP6+	22 ^a	(68.7)	19	(34.5)
E6 VPH-16	10	(31.2)	13	(23.7)

^a Once de las 22 muestras positivas a GP5+/GP6+ amplificaron ADN-VPH inicialmente con MY09/MY11.

Cuadro 4. Proporción de tipos virales de las muestras positivas a ADN-VPH en 32 casos y 55 controles.

Tipo viral	Casos		Controles	
	n	(%)	n	(%)
VPH-2	1	(3.1)	3	(5.5)
VPH-6	---	---	4	(7.3)
VPH-11	1	(3.1)	7	(12.7)
VPH-13	1	(3.1)	4	(7.3)
VPH-16	15	(46.9)	15	(27.3)
VPH-18	5	(15.7)	5	(9.1)
VPH-31	---	---	2	(3.6)
VPH-32	1	(3.1)	1	(1.8)
VPH-33	2	(6.2)	1	(1.8)
VPH-35	1	(3.1)	---	---
VPH-52	---	---	1	(1.8)
NI	5	(15.7)	12	(21.8)

NI=Secuencias no identificadas sugestivas de infección múltiple.

Cuadro 5. Distribución de las características demográficas en casos y controles.

	Casos (n=62)	Controles (n=248)
	n (%)	n (%)
<i>Género</i>		
Femenino	29 (46.8)	116 (46.7)
Masculino	33 (53.2)	132 (53.3)
<i>Mediana de edad (años)</i>	62 (55-72)	59 (54-70)
<i>Estado civil</i>		
Casado	35 (56.5)	152 (61.3)
No casado	27 (43.5)	96 (38.7)
<i>Escolaridad</i>		
Analfabeta	8 (12.9)	6 (2.4)
Primaria	25 (40.3)	118 (47.0)
Secundaria	14 (38.7)	79 (31.5)
Preparatoria	8 (12.9)	22 (8.8)
Licenciatura	7 (11.3)	26 (10.4)
<i>Ocupación</i>		
Desempleado	8 (12.9)	22 (8.8)
Jubilado	5 (8.1)	28 (11.2)
Ama de casa	25 (40.3)	84 (33.5)
Profesionista	6 (9.7)	16 (6.4)
Técnico de nivel medio	5 (8.1)	15 (6.0)
Empleado de oficina	3 (4.8)	30 (12.0)
Trabajadores vendedores	6 (9.7)	28 (11.2)
Agricultores, operarios y artesanos	3 (6.4)	28 (11.2)

Cuadro 6. Distribución de las características del consumo de tabaco y alcohol en los casos y los controles

	Casos (n=62)	Controles (n=248)
<i>Edad de inicio tabaquismo (Md, Q₁-Q₃)</i>	19.5 (17-22)	19.0 (15-22)
<i>Número de años de consumo de tabaco (Md, Q₁-Q₃)</i>		
Fumador	40.0 (35.0-46.5)	34.0 (20.0-49.5)
Ex fumador	32.0 (10.0-35.0)	27.0 (15.7-39.7)
<i>Años sin consumir tabaco (Md, Q₁-Q₃)</i>		
Ex fumador	12 (6-21)	13 (9-24)
<i>Paquetes-año</i>	n (%)	n (%)
0	30 (48.4)	196 (79.0)
1 - 25	16 (25.8)	47 (19.0)
≥ 25	16 (25.8)	5 (2.0)
<i>Edad de inicio etilismo (Md, Q₁-Q₃)</i>	20.0 (18.5-26.0)	20.0 (16.7-25.2)
<i>Años de consumo de alcohol (Md, Q₁-Q₃)</i>		
Bebedor	39.0 (32.5-41.0)	36.5 (24.7-45.2)
Ex bebedor	35.0 (26.7-54.5)	30.0 (18.7-35.5)
<i>Años sin consumir alcohol (Md, Q₁-Q₃)</i>	8.8 (2.2-18.2)	15.0 (8.5-17.2)
<i>UB-año</i>	n (%)	n (%)
0	41 (66.1)	218 (87.9)
1 - 16	9 (14.5)	16 (6.5)
≥ 16	12 (19.4)	14 (5.6)

Md= mediana, Q₁-Q₃= intervalo intercuartilar, UB=unidades de bebida

Cuadro 7. Razones de momios crudas y sus intervalos de confianza al 95% para la infección por VPH en la mucosa bucal.

	Casos (n=62)		Controles (n=248)		RM crudas	(IC 95%)	P
	n	(%)	n	(%)			
<i>VPH alto riesgo</i>							
Negativo	39	(62.9)	224	(90.3)	1.00		
Positivo	23	(37.1)	24	(9.7)	6.21	(2.98 – 12.97)	0.001
<i>VPH</i>							
Negativo	35	(56.5)	205	(82.7)	1.00		
Positivo	27	(43.5)	43	(17.3)	3.41	(1.89 – 6.15)	0.001
<i>VPH bajo riesgo</i>							
Negativo	58	(93.5)	29	(92.3)	1.00		
Positivo	4	(6.5)	19	(7.7)	0.83	(0.27 – 2.53)	0.747

RM=Razón de momios, IC=Intervalo de confianza

Cuadro 8. Razones de momios crudas e intervalos de confianza al 95% para cáncer bucal, de acuerdo a las características clínicas de los grupos.

	RM ^a crudas	(IC 95%)	P
<i>Historia familiar de cáncer</i>			
Negativo	1.00		
Positivo	4.16	(2.13 – 8.14)	0.001
<i>Tabaco</i>			
No	1.00		
Fumador	7.76	(3.60 – 16.72)	0.001
Ex-fumador	2.22	(0.86 – 5.75)	0.100
<i>Tabaco (paquetes-año)</i>			
0	1.00		
< 25	2.27	(1.00 – 5.13)	0.049
≥ 25	27.07	(7.67 – 95.58)	0.000
<i>Alcohol</i>			
No	1.00		
Bebe	6.33	(2.77 – 14.44)	0.001
Bebió	2.00	(0.60 – 6.70)	0.259
<i>Alcohol (unidades de bebida-año)</i>			
0	1.00		
< 16	2.11	(0.96 – 4.64)	0.062
≥ 16	38.55	(8.65 – 171.50)	0.001

RM=Razón de momios, IC=Intervalo de confianza. ^aRM obtenidas a través de regresión logística condicional.

Cuadro 9. Razones de momios ajustadas para cáncer bucal obtenidas del modelo de regresión logística condicional.

Variable	RM ajustada ^a	(IC 95%)	P
Historia familiar de cáncer ^b			
No	1.00		
Si	3.61	(1.44 – 8.99)	0.006
VPH-AR			
Negativo	1.00		
Positivo	5.77	(2.41 - 13.81)	0.0001
Alcohol - tabaco (interacción) ^c			
Alcohol No 0 paquetes-año	1.00		
Alcohol Si 0 paquetes-año	3.19	(1.14 - 8.90)	0.027
Alcohol No < 25 paquetes-año	1.00		
Alcohol Si < 25 paquetes-año	28.44	(4.08 - 198.44)	0.001
Alcohol No 0 paquetes-año	1.00		
Alcohol No < 25 paquetes-año	3.85	(1.24 - 11.959)	0.020
Alcohol Si 0 paquetes-año	1.00		
Alcohol Si < 25 paquetes-año	34.29	(4.62 - 254.28)	0.01
Alcohol No < 25 paquetes-año	1.00		
Alcohol No ≥ 25 paquetes-año	2.65	(0.57 - 12.39)	0.20
Alcohol No 0 paquetes-año	1.00		
Alcohol Si ≥ 25 paquetes-año	10.21	(2.48 - 42.04)	0.001
Alcohol No 0 paquetes-año	1.00		
Alcohol Si < 25 paquetes-año	109.45	(16.80 - 713.07)	0.0001

RM=Razón de momios, IC=Intervalo de confianza. ^a RM ajustada: las razones de momios se obtuvieron a través del modelo ajustado de todas las variables en la regresión logística condicional en el modelo, ^bFamiliares en primera línea, ^cNo se estima la interacción entre alcohol y tabaco ≥ 25 paquetes-año debido al reducido número de sujetos en ese estrato.

Cuadro 10. Hábitos sexuales en pacientes con CECB de acuerdo a la presencia de VPH-AR

	VPH-AR negativo (n=39)	VPH-AR positivo (n=23)	<i>P</i>
	n (%)	n (%)	
Mediana de edad VSA (Q ₁ -Q ₃)	19 (17 -19)	16 (15 – 18)	0.019^a
Mediana PS totales (Q ₁ -Q ₃)	3 (1– 4)	4 (2 – 7)	0.033^a
PS totales categorizadas			
< 5	30 (88.2)	15 (68.2)	0.089 ^b
≥ 5	4 (11.8)	7 (31.8)	
Mediana PS último año (Q ₁ -Q ₃)	1 (0 – 1.5)	1 (1 – 4)	0.192 ^a
PS totales último año categorizadas			
Ninguna	12 (36.4)	3 (14.3)	0.209 ^b
1 - 3	20 (60.6)	17 (81.0)	
Contacto orogenital			
Si	8 (24.2)	9 (47.4)	0.126 ^b
No	25 (75.8)	10 (52.6)	
Número de parejas orogenitales			
Ninguna	24 (75.0)	10 (52.6)	0.131 ^b
1 – 5	8 (25.0)	9 (19.6)	

^aU-Mann-Whitney, ^bPrueba exacta de Fisher. VSA=Vida sexual activa, PS=Parejas sexuales, Q₁-Q₃= Intervalo intercuartilar.

Cuadro 11. Características demográficas y clínicas de 12 pacientes con cáncer bucal positivo a VPH-16.

ID	Género	Edad	Consumo de tabaco	Consumo de alcohol	Sitio	Estadio clínico	Grado histológico
B1	F	52	+	-	Encía	IV	MD
B2	M	62	+	-	Lengua	III	BD
B3	F	66	+	-	Lengua	III	BD
B4	M	55	+	+	Lengua	IV	MD
B5	M	71	+	+	Piso de boca	IV	MD
B6	M	31	-	-	Paladar	III	BD
B7	M	53	-	-	Lengua	III	BD
B8	F	75	-	-	Encía	III	BD
B9	F	59	-	-	Lengua	I	BD
B10	F	56	-	-	Lengua	IV	BD
B11	M	57	-	-	Encía	I	BD
B12	F	31	-	-	Lengua	III	MD

F=Femenino, M=Masculino, MD=Moderadamente diferenciado, BD=Bien diferenciado

DISCUSIÓN

8.1 Aspectos relacionados al método del estudio

El diseño del presente estudio de casos y controles pareado por edad y género, fue seleccionado considerando que el cáncer bucal es una enfermedad con baja incidencia en México y de larga evolución, y tomando como base las recomendaciones del grupo STROBE (2007). Los estudios de casos y controles, a pesar de sus limitaciones, constituyen una alternativa costo-efectiva para identificar factores de riesgo y generar hipótesis para estudios subsecuentes (Lazcano-Ponce y cols. 2001).

Las consideraciones metodológicas para los estudios de casos y controles son, principalmente, la selección apropiada de los grupos de casos y controles, la correcta definición y detección de la enfermedad y exposición en estudio, y la probabilidad basal de desarrollar la enfermedad entre ambos grupos (Hayden y col. 1982).

De acuerdo a Lazcano-Ponce y col (2001), la razón de momios tiende a parecerse al riesgo relativo (RR) cuando los casos del estudio son incidentes y la exposición que la precede es de larga duración. En el presente estudio, la inclusión de casos fue llevada a cabo de manera consecutiva, y se incorporaron una gran proporción de los casos incidentes de CECB del centro de referencia oncológico. La razón de momios se aproxima al RR bajo dos condiciones, cuando la probabilidad condicional de la enfermedad dada la exposición ($P_{enf/exp}$) es baja y cuando la probabilidad de la enfermedad dada la no exposición ($P_{enf/no-exp}$) también es baja. Si el riesgo de la enfermedad es bajo, es decir la enfermedad es rara en ambos grupos (expuestos y no expuestos), las probabilidades ($P_{enf/exp}$) y ($P_{enf/noexp}$) son cercanas a 1, por lo que la RM se aproxima al RR (Jewell

2000). Con base en lo anterior, y debido a que el CB es un padecimiento de baja incidencia, es posible usar el término riesgo pese a que se trata de un estudio de caso y controles.

Con el fin de aumentar la eficiencia estadística y disminuir el sesgo asociado a factores de confusión directa, cada caso fue pareado con cuatro controles (Lazcano-Ponce y col. 2001), que fueron seleccionados de áreas socio-demográficas comparables a las de los casos, e independiente de su condición de expuestos y no expuestos. En ambos grupos se obtuvo un alto grado de participación, y todos los participantes (casos y controles) fueron examinados e interrogados por la misma persona, quien también fue la responsable de la recolección de las muestras.

Considerando que la inclusión de controles hospitalarios induce el sesgo de Berkson (Hayden y col. 1982), se decidió incorporar un grupo control adicional, elegido de una comunidad cercana al hospital del que se obtuvieron los casos, y con características socio-económicas similares tanto al grupo de casos, como al grupo control hospitalario. La comparación entre los controles hospitalarios y los vecindarios no arrojó discrepancias, por lo que las asociaciones fueron obtenidas a través del análisis de un solo grupo control.

Dentro de las limitantes del estudio, es necesario considerar que debido a que se partió del efecto en busca de la posible causa, el estudio es susceptible a diferentes sesgos o errores de interpretación. Uno de ellos es sesgo de información, ya que la exposición (VPH, tabaco, alcohol) y las variables relacionadas (antecedentes familiares de cáncer, hábitos sexuales, etc.), fueron medidas después del desarrollo de la enfermedad. Sin

embargo, asumiendo que la exposición que precede al desarrollo del cáncer bucal es de larga duración, la razón de momios obtenida se considera confiable, ya que es menos probable que el estatus de la enfermedad pueda modificar la exposición que se está estudiando (Lazcano-Ponce y col. 2001).

8.2 Procedimientos de laboratorio

La presencia de VPH en la mucosa bucal ha sido estimada por medio de diferentes técnicas; en los primeros estudios realizados, los métodos diagnósticos utilizados fueron southern blot, dot blot (Yeudall y Campo, 1991; Brandsma y col. 1989; Chang y col. 1989), hibridación in situ e inmunohistoquímica (González-Moles y col. 1994; Abdelsayed 1991; Syrjänen y col, 1983). Dentro de las desventajas de estos métodos están que consumen mayor tiempo para su realización, requieren cantidades mayores de ADN, y tienen una menor sensibilidad que la técnica de PCR (Franceschi y col. 1996).

La alta sensibilidad de la técnica de PCR para la detección de VPH ha sido confirmada en diferentes estudios (Ha y Califano, 2004; Guerrero y col. 1992), tanto en muestras cérvico-vaginales como en bucales, razón por la que se incorporó como método diagnóstico en el presente estudio. Miller y White (1996) informan en un meta-análisis, que los índices más altos de detección viral son alcanzados con PCR (37.1%), por encima del Southern blot (25.2%), y de la hibridación in situ o inmunohistoquímica (25.2%).

En la presente investigación, se incrementó la capacidad de detección viral con el uso de dos juegos de oligonucleótidos universales (MY09/11 y GP5+/6+) que amplifican diferentes fragmentos de la región L1 de VPH (De Roda y col, 1995; Manos y col, 1989).

En las muestras analizadas, los índices más altos de detección se lograron con GP5+/6+, identificando un 10.3% (30/276) adicional de positividad (22.4%, casos y 8.4%, controles), en muestras previamente negativas a MY09/11.

Los oligonucleótidos MY09/11 han mostrado ser muy útiles en otros estudios (Chang y col. 2003; Badaraco y col. 2000; Schwartz y col. 1998), por lo que no descartamos que la baja eficiencia que obtuvimos con MY09/11 se deba a problemas técnicos específicos, como la baja pureza del ADN utilizado, el muestreo inapropiado o la presencia de inhibidores de la PCR (Carrillo y col. 2004). La amplificación de muestras con ADN fragmentado es más eficiente en fragmentos pequeños que en grandes (Carrillo y col. 2004), por lo que el hecho de que MY09/11 amplifique fragmentos de 450 pb y GP5+/6+ de 150 pb, pudiera explicar la alta eficiencia de GP5+/6+ encontrada en este estudio. Por otro lado, es necesario considerar la posibilidad de que algunos tipos virales no hayan sido identificados, a pesar de la alta sensibilidad de los métodos utilizados, por lo que el diseño de nuevos oligonucleótidos pudiera permitir el reconocimiento de tipos virales no identificados actualmente en la mucosa bucal.

Adicionalmente, en los procedimientos realizados se siguieron métodos de control de contaminación (Boy y col. 2006), con lo que se redujo la probabilidad de falsos-positivos. Todos los procedimientos fueron realizados siguiendo las recomendaciones universales: la mezcla de reacción para PCR fue hecha en una habitación distinta a la usada para la preparación del ADN. Por otro lado, las muestras fueron analizadas aleatoriamente, y de forma ciega a características particulares de los participantes que pudieran introducir un sesgo de severidad diagnóstica (ej. estatus de caso/control, datos clínicos, etc).

8.3 Factores de riesgo para cáncer bucal

8.3.1 Asociación del VPH y cáncer bucal

El presente estudio de casos y controles representa la primera investigación en pacientes mexicanos, que demuestra una fuerte asociación entre la infección de VPH de alto riesgo y el cáncer bucal (RM=5.8), independientemente del uso de tabaco y alcohol (Anaya-Saavedra y col, 2007).

Las asociaciones encontradas para VPH y VPH-AR con cáncer bucal (RM=3.4 y 6.2, respectivamente) coinciden con las razones de momios reportadas en estudios previos (Ha y Califano, 2004). En dos estudios de casos y controles, Smith y col. (2000 y 1998) demostraron una asociación de VPH-AR con cáncer bucal (RM=2.6 y 3.7, respectivamente), después de ajustar con edad, consumo de tabaco y alcohol. En un meta-análisis que examinó de manera independiente 94 estudios de cáncer bucal y VPH, se informa que el VPH es 4.7 veces más común en mucosa bucal afectada, que en tejidos bucales normales (Miller y Johnston 2000). Resultados similares fueron presentados previamente, Schwartz y col. (1998) encontraron que los individuos con VPH tenían 6 veces más riesgo de presentar cáncer bucal que los individuos sin la infección. En contraste, en un estudio de casos y controles poblacional, realizado en Suiza (Hanson y col. 2005), se informa que los individuos con VPH-AR tienen un riesgo 63 veces mayor de presentar cáncer bucal (RM=63 IC 95%, 14 - 480).

La asociación de VPH y cáncer es mayor cuando se consideran otras localizaciones diferentes a la bucal; la razón de momios para VPH-AR en cáncer de orofaringe y base de lengua ha sido informado con un riesgo de 230 (IC 95%, 45 - 1200), por Hanson y col.

(2005). En contraste, un estudio reciente de cáncer orofaríngeo (D'Souza y col. 2007), la razón de momios para VPH-AR es de 12.3, y de 14.4 para VPH-16 en específico. Adicionalmente, en un estudio de casos y controles de carcinoma laríngeo, desarrollado en Estados Unidos, se informa que los individuos con VPH tienen un riesgo tres veces mayor para la enfermedad, después de ajustar por variables como la edad, y el consumo de tabaco y alcohol (Smith y col. 2000).

La frecuencia de VPH en CECB reportada en la mayoría de los estudios publicados ha sido muy variable (3.9% a 73.6%) (Herrero y col. 2003; Balaram y col. 1995). En el presente estudio, en 43% de las muestras de CECB se identificó VPH, similar al 42% encontrado en un estudio de cáncer bucal realizado en el mismo centro de referencia del presente estudio (INCan) (Ibieta y col. 2005); sin embargo, debido a la falta de un grupo control en el estudio de Ibieta y col. (2005), la comparación de asociaciones observadas en ambos estudios no es posible. La frecuencia encontrada es comparable también al 40% reportado por Hanson y col. (2005), en un estudio de casos y controles de carcinoma bucal y orofaríngeo realizado en un estudio de casos y controles suizo con base poblacional.

Otros estudios han informado frecuencias cercanas a la encontrada en el presente, variando de 35% a 54% (Tachezy y col. 2005; Chang y col. 2003; Sugiyama y col. 2003; Adams y col. 1999; Alvarez-Alvarez y col. 1997; Cruz y col. 1996; Noble-Topham y col. 1993). Adicionalmente, en una revisión sistemática reciente que incluyó 60 estudios de 26 países, la prevalencia general de VPH para cáncer bucal fue de 23.5% (IC 95%, 21.9 – 25.1), aumentando para el laríngeo en 24% (IC 95%, 21.8 – 26.3) y para el orofaríngeo hasta 35.6% (IC 95%, 32.6 – 38.7) (Kreimer y col. 2005).

De acuerdo con Kreimer y col. (2005), la prevalencia de VPH es inversamente proporcional al tamaño de la muestra estudiada. Así, la prevalencia más baja de VPH en CECB que se ha encontrado (3.9%), proviene de un estudio multicéntrico realizado en nueve países, en el que se incluyeron 1600 casos y 1700 controles (Herrero y col. 2003). Otros factores que influyen en las diferencias reportadas son entre otros, la localización geográfica de los individuos, el sitio de obtención de la muestra, la forma de recolección, el medio en el que se incluye la muestra, el método de purificación de ADN, y los ensayos moleculares utilizados para la detección del ADN viral (Kreimer y col. 2005; Syrjanen y col. 2005).

El lugar geográfico es un factor relevante en las frecuencias observadas, de esta manera, la prevalencia de VPH en CECB en Asia (33%) es más alta que en Europa (16%) y Norteamérica (16.1%) (Kreimer y col. 2005). Por otra parte, la prevalencia de VPH para cáncer orofaríngeo es mayor en Norteamérica y Asia (47.0 y 46.3%, respectivamente), mientras que en Europa es de 28.2%. Las discrepancias geográficas identificadas pueden deberse a diferencias en la distribución de otros factores de riesgo que actúan como co-carcinógenos, como el tabaco y el alcohol (Kreimer y col. 2005).

El presente estudio incluyó únicamente lesiones consideradas dentro de la cavidad bucal (ICD-10), debido a que la asociación del VPH con lesiones de orofaringe y laringe ha sido más consistente en estudios previos (Kreimer y col. 2005, Syrjanen 2005, Tachezy y col. 2005). Se ha demostrado que la presencia de VPH es mayor en neoplasias de orofaringe (35.6%) que en las bucales o laringeas (23.5% y 24.0%, respectivamente) (Kreimer y col. 2005). Tachezy y col. (2005) encontraron frecuencias menores para VPH-AR en carcinoma de la mucosa bucal (25%) que en orofaringe (57%). Los papilomavirus tienen predilección por sitios orofaríngeos, en especial por los no queratinizados, como las amígdalas (Syrjanen

2005); la yuxtaposición entre el epitelio escamoso y el tejido linfático amigdalino es semejante a la unión escamo-columnar del cérvix y útero, sitio donde se ubican casi todos las neoplasias asociadas a VPH del tracto genital femenino (Winer y col. 2003).

La recolección de las muestras del presente estudio fue llevada a cabo con base en estudios previos (Smith y col. 2004; Syrjänen y Syrjänen, 1989), que indican que las células descamadas de la mucosa permiten una adecuada amplificación de VPH-ADN. Otros estudios (Furrer y col. 2006; Lawton y col. 1992) coinciden en que los mayores índices de detección de HPV-ADN se logran por medio del enjuague bucal y el raspado de la mucosa. Se ha sugerido que la presencia de VPH aumenta progresivamente desde la capa basal (5.8%) hasta las capas superficiales de la mucosa bucal (100%), fenómeno que explica la sensibilidad superior de raspados y enjuagues sobre la biopsia (Syrjänen y Syrjänen, 1989).

La prevalencia de VPH-AR (16, 18, 33 y 35) encontrada en las muestras de CB del presente estudio fue de 37%, similar al 36% encontrado por Göran-Hansson y col. (2005). El tipo viral más frecuente en los casos fue VPH-16 (24.2%), lo que es consistente con la mayoría de los reportes de cáncer bucal (Ibieta y col. 2005; Kreimer y col. 2005; Syrjänen 2005), y confirmado en un estudio reciente de casos y controles anidado realizado en cáncer orofaríngeo (D'Souza y col. 2007). El VPH-16 es también el tipo viral más común en mujeres con CaCU, y ha sido fuente principal en el estudio del ciclo viral y carcinogénesis de los papilomavirus (Doorbar 2004).

Al igual que en numerosos reportes (D'Souza y col. 2007; Kreimer y col. 2005; Adams y col. 1999; Schwartz y col. 1998), el segundo tipo viral más frecuente fue el VPH-

18, (18.5%). En contraste, estudios realizados en la India, Japón, Corea, Grecia e Italia (Shin y col. 2002; Badaraco y col. 2000; Aggelopoulou y col. 1999; Balaram y col. 1995) refieren al VPH-18 como el papilomavirus más común en cáncer bucal y orofaríngeo. Aunque los patrones de distribución de los genotipos reflejan el origen geográfico de las muestras (Giovanelli y col. 2002), las similitudes genéticas entre poblaciones, como las reportadas entre la población del sur de Italia y la griega (Rickards y col. 1995) pudieran explicar la mayor frecuencia de VPH-18 en estas poblaciones. El VPH-18 tiene preferencia además por sitios anatómicos, ha sido encontrado con mayor frecuencia en cáncer bucal (34.5%) que en laríngeo (17.2%) y orofaríngeo (2.9%) (Kreimer y col. 2005).

En los controles, la frecuencia del VPH-AR en la mucosa bucal fue sólo de 9.7%, similar a la reportada en la mayoría de los estudios (0.6% a 11%) (Furrer y col. 2006; Hanson y col. 2005; Koppikar y col. 2005; Kurose y col. 2004; Ha y Califano, 2004; Giovanelli y col. 2002; Mork y col. 2001; Summersgill y col. 2000; Schwartz y col. 1998; Smith y col, 1998). En otros estudios, la frecuencia de VPH-AR en mucosa normal ha sido hasta de 36% (Sugiyama y col. 2003), y de 82%, cuando se analizaron todos los tipos virales de VPH (Terai y col. 1999). Se ha sugerido que los factores geográficos y biológicos, como las condiciones inmunológicas de los individuos, influyen con la presencia de VPH-AR en la mucosa bucal normal (Ha y Califano, 2004). La identificación de VPH en la mucosa bucal normal indica que su presencia no necesariamente conduce a malignidad; es necesario enfatizar que el cáncer es una enfermedad multifactorial en el que diversos factores tienen que coincidir para el desarrollo del evento maligno (Ha y Califano, 2004).

La identificación de la asociación del VPH en lesiones cancerosas de la mucosa bucal, aunada a la baja prevalencia de consumo de tabaco en los casos positivos a VPH, sugiere que el proceso carcinogénico en los individuos VPH+ sigue un camino distinto a la oncogénesis relacionada al consumo de tabaco y alcohol (D'Souza y col. 2007; Gillison y col. 2004; Ha y Califano, 2004).

8.3.2 Asociación del tabaco y el alcohol con el cáncer bucal

Acorde con lo descrito previamente (Scully y col. 2000; Johnson 2001; Castellsagué y col. 2004), los resultados del presente estudio confirman al tabaco y al alcohol como factores de riesgo importantes en el desarrollo de CECB. Todas las mediciones relativas al consumo de tabaco y alcohol estuvieron fuertemente asociadas con el riesgo de CECB; el que aumenta al incrementarse el grado de consumo. La interacción entre alcohol y tabaco encontrada, concuerda con el efecto sinérgico reportado previamente (Castellsague y col. 2004; Johnson 2001), que actúa como un factor de riesgo para el desarrollo de los procesos malignos del tracto digestivo superior.

Un hallazgo importante fue que la mayor proporción de fumadores y bebedores se encontró en pacientes con CECB sin VPH-AR, como se ha informado en diversos estudios (D'Souza y col. 2007; Smith y col. 2004; Hafkamp y col. 2003; Herrero y col. 2003; Klussman y col. 2001; Ritchie y col. 2003; Gillison y col. 2000). Otros han encontrado proporciones similares de VPH en fumadores y no fumadores (Paz y col. 1997; Sisk y col. 2000). Una posible respuesta a este hallazgo es que el tabaco, debido a la hiperqueratinización local, confiere a la mucosa un efecto protector contra microtraumatismos, necesarios para la introducción del VPH a las capas basales de los

tejidos (Ritchie y col. 2003). Sin embargo, se requieren más estudios que confirmen esta observación.

Se ha propuesto que la carcinogénesis bucal se desarrolla por dos vías diferentes, una asociada a los factores clásicos de oncogénesis bucal (tabaco y alcohol), y otra favorecida por la presencia de VPH-AR (Gillison y col. 2000; Herrero y col. 2003; D'Souza y col. 2007). Nosotros observamos que en más de la mitad de los pacientes con CECB y VPH-AR, no existían antecedentes de tabaco y/o alcohol que explicaran el desarrollo de la neoplasia. En ellos, aun queda por determinar la contribución precisa del virus en el proceso carcinogénico, con lo que se podrán establecer medidas preventivas.

Es importante destacar que en 16.1% de los individuos con cáncer bucal, no se identificó ninguno de los factores asociados a CB: VPH-AR, consumo de tabaco o alcohol. Considerando que la carcinogénesis es un proceso multifactorial de daño genético acumulado (Carbone y Pass, 2004), una proporción de factores indeterminados pudieran estar asociados como iniciadores o promotores del proceso carcinogénico. En este sentido, se requieren estudios que involucren mecanismos genéticos y epigenéticos que pudieran estar involucrados en la transformación maligna.

8.3.3 Asociación de la historia familiar de cáncer con el cáncer bucal

Los individuos con historia familiar de cáncer en primera línea tenían 3.6 veces más riesgo de tener cáncer bucal, independientemente de VPH y el consumo de tabaco y alcohol; sin embargo, existe controversia en el hallazgo de esta asociación (D'Souza y col. 2007; Jefferies y col. 1999; Foulkes y col. 1996; Cooper y col. 1995; Goldstein y col. 1994).

Algunos estudios (Foulkes y col. 1996; Cooper y col. 1995; Foulkes y col. 1995), han encontrado riesgos relativos altos para cáncer bucal y orofaríngeo en individuos con familiares en primera línea que tenían antecedentes de cáncer bucal (RR: 3.4 - 3.79); el riesgo encontrado aumenta considerablemente cuando el análisis se restringe a los hermanos (RR: 8.6 - 14.6).

En contraste, Goldstein y col. (1994) no encontraron asociaciones similares al analizar antecedentes familiares de cáncer bucal y orofaríngeo. Se ha propuesto que los factores ambientales pudieran ser responsables de los efectos familiares observados, especialmente en procesos malignos en sitios relacionados al consumo de tabaco, como el tracto respiratorio y gastrointestinal superior (Lewellyn y col. 2001; Goldstein y col. 1994),

Sin embargo, aun considerando lo anterior, es difícil establecer la contribución precisa de factores ambientales y hereditarios (Lewellyn y col. 2001). Además, la calidad de la información obtenida depende de la memoria de los participantes, y los casos, por su contexto de salud, tienen una mayor susceptibilidad al recuerdo preciso que los controles, por lo que es necesario considerar la posible presencia de un sesgo de memoria (Hernández-Ávila y col. 2000).

En este sentido, es necesario realizar estudios que además de incluir la variable como parte de los antecedentes familiares del paciente, incorpore la búsqueda de factores ambientales que pudieran estar involucrados en la carcinogénesis, así como de ensayos moleculares que permitan el reconocimiento de patrones genéticos que pudieran identificar de una manera objetiva la presencia real de esta asociación.

8.3.4 Características clínico-patológicas y cáncer bucal

Entre los casos positivos a VPH-AR encontramos una menor proporción de carcinomas bien diferenciados; no obstante, la diferencia no fue estadísticamente significativa, probablemente por el reducido número de casos positivos a VPH-AR en el estudio. Diversos trabajos han indicado que la detección de VPH se correlaciona con carcinomas mal diferenciados (Schwartz y col. 1998; Klussman y col. 2001; Schwartz y col. 2001). Los tumores mal diferenciados son positivos a VPH (RM= 9.1 IC 95%, 4.6 - 18) con mayor frecuencia que los bien y moderadamente diferenciados (Gillison y col. 2000). De acuerdo a algunos autores, los tumores VPH+ presentan una morfología basaloide, no-queratinizante y con un inmunofenotipo distinto, como una fuerte y difusa positividad a anticuerpos p16 y Ki67, y baja positividad a p53 (El-Mofty y col. 2006; Gillison y col. 2000).

La proporción de pacientes en estadios avanzados de la enfermedad fue alta (86%), similar al 74% reportado en el estudio de Ibieta y col. (2005). Se ha informado que en México, el cáncer bucal es diagnosticado en etapas avanzadas de la enfermedad (estadios III y IV) (Anaya-Saavedra y col. 2007; Frías-Mendivil y col. 1997; Ramírez-Amador y col. 1995), empeorando el pronóstico de los pacientes y reduciendo su calidad de vida.

8.3.5 Hábitos sexuales y cáncer bucal

Diversos estudios epidemiológicos han tratado de explicar la vía de transmisión del virus a la mucosa bucal. La transmisión vertical durante el parto, la autoinoculación a través de lesiones peri-ungueales (Kashima y col. 1992), y la transmisión por fómites contaminados han sido mecanismos considerados (Franceschi y col. 1996); sin embargo, la

mayor parte de la información sugiere que la presencia de VPH en la mucosa bucal está relacionada a los hábitos sexuales (Scully 2005; Scully 2002).

En nuestros hallazgos, el número de parejas sexuales y la edad de inicio de vida sexual fueron variables asociadas a la presencia de VPH-AR en los casos ($p=0.033$ y $p=0.019$, respectivamente). Otros autores han reportado que un alto número de parejas sexuales, así como el inicio temprano de vida sexual son factores de riesgo para cáncer bucal, después de ajustar por alcohol y tabaco (D'Souza y col. 2007; Scully y col. 2005; Schwartz y col. 1998; Smith y col. 2004).

Aunque no encontramos una asociación significativa entre el contacto oro-genital y VPH-AR, el contacto oro-genital fue más frecuente entre los casos positivos a VPH-AR. Se ha descrito que los individuos con historia de contacto oro-genital tienen un riesgo aumentado de tener cáncer bucal y orofaríngeo positivo a VPH-AR (OR=4.4, 95%IC=1.5-12.7), después de ajustar por género, localización de la neoplasia y consumo de tabaco (Ritchie y col. 2003).

Una limitación potencial en el estudio es la posible subestimación de los hallazgos acerca de la conducta sexual. Aunque el cuestionario fue llenado con absoluta confidencialidad, y que se obtuvo un alto índice de respuesta, es necesario considerar que debido a la naturaleza íntima de las preguntas, y la edad de los participantes, la validez de estos resultados es limitada.

8.4 Patrones de metilación en VPH-16 de CECB

El presente estudio, representa el primer análisis de los patrones de metilación de algunas de las regiones más importantes del VPH-16 en CECB (parte del gen L1, la LCR, el promotor y el enhancer viral). En esta investigación se consideró un segmento de 913 pares de bases del genoma viral, que incluye un total de 2,244 sitios. Los datos obtenidos confirman que el ADN del VPH-16 asociado a cáncer bucal, al igual que lo informado previamente en neoplasias ano-genitales (Kalantari y col, 2004; Turan y col, 2006), está afectado por la metilación.

8.4.1 Metilación en L1 de VPH-16

En las tres islas CpGs analizadas en la región L1, encontramos una frecuencia general de metilación (34%) muy similar a la reportada en CaCU (43 a 54%) (Kalantari y col, 2004). En cuatro de las 12 muestras analizadas (33.3%), el promedio de metilación encontrado fue de 57% (50 a 65%), una frecuencia que excede a lo reportado previamente para CaCU (Turán y col. 2006; Kalantari y col, 2004).

La región L1 ha sido encontrada hipometilada en infecciones asintomáticas y lesiones precursoras de cérvix, e hipermetilada (de 2 a 4 veces más) en CaCU (Kalantari y col. 2004). Estas observaciones sugieren que la metilación de L1 puede ser un biomarcador de la progresión carcinogénica (Turán y col. 2006). Adicionalmente, la hipermetilación de L1 en VPH-18 se ha asociado a integración genómica, y como consecuencia, con predisposición a la transformación maligna (Turán y col. 2006)

En lesiones malignas, L1 no se transcribe después de la recombinación, localizándose por arriba de los elementos regulatorios de la transcripción viral; sin embargo, debido a que la LCR tampoco se transcribe, se ha propuesto que el estado de hipometilación se mantiene por medio de la interacción de factores de transcripción (Turán y col. 2006).

8.4.2 Metilación en LCR de VPH-16

La LCR de los papilomavirus es un segmento genómico que contiene un gran número de elementos *cis* que gobiernan la expresión génica y la replicación del virus, específicamente en dos sitios E2, que son importantes para la regulación de E6 y E7 (Gloss y Bernard, 1990). Esta región contiene varios motivos reguladores de la transcripción, como los de la familia AP-1, YY1, y SP1, así como el origen de la replicación.

La frecuencia general de metilación encontrada en la LCR del virus fue de 30.2%. Se ha informado que la LCR de VPH-16 se encuentra selectivamente hipometilada en poblaciones celulares bien diferenciadas, mientras que las pobremente diferenciadas se encuentran metiladas (Kim y col. 2003). Debido posiblemente al reducido número de muestras analizadas (12), no encontramos diferencias entre el tipo histológico y el grado de metilación en este sitio.

La hipometilación del genoma viral en células bien diferenciadas puede favorecer la acetilación, y como consecuencia, una cromatina más abierta, lo que conduce a transcripción y quizá, a replicación de ADN (Kim y col. 2003). Así, la hipometilación de la LCR puede contribuir a la transcripción y amplificación de ADN viral.

8.4.3 Metilación en el enhancer de VPH-16.

Aunque el enhancer se encontró casi totalmente desmetilado en 8 de las 12 muestras (66.7%), en las cuatro muestras restantes la frecuencia de metilación fue muy alta (76%), variando de 66 a 90%. En la línea celular CasKi, múltiples genomas de VPH-16 se encuentran transcripcionalmente inactivos, y un pequeño porcentaje presenta metilación en el enhancer (List y col. 1994).

El enhancer de VPH-16 regula la expresión de los oncogenes E6 y E7, por lo que las frecuencias de metilación encontradas en esta región sugieren que la metilación puede ser un indicador de progresión carcinogénica en el cáncer de la mucosa bucal, de manera similar a las neoplasias ano-genitales.

Se ha demostrado que en lesiones pre-cancerosas y cancerosas, la región del enhancer y el promotor de al menos una copia de VPH-16 debe permanecer desmetilada, para poder transcribir eficientemente los oncogenes E6 y E7, similar a lo encontrado en la línea celular SiHa, que tiene solo una copia de VPH-16 transcripcionalmente activa. Sin embargo, el genoma del VPH-16 en muchos de los CaCU estudiados previamente se ha encontrado metilado (debido posiblemente a la disposición de los tándems y a recombinación cromosomal), y como consecuencia, inactivo transcripcionalmente, por lo que su expresión oncogénica continúa a partir de una copia activa (Badal y col. 2003; Bhattacharjee y col. 2006).

8.4.4 Metilación en el promotor de VPH-16

La metilación del promotor de VPH-16 había sido informada previamente en tumores anales y de cuello uterino (Wiley y col. 2005; Kalantari y col. 2004), pero no en pacientes con cáncer bucal. El presente estudio demuestra hipermetilación aberrante en muestras bucales de pacientes positivos a VPH-16. La frecuencia de metilación general encontrada en el segmento del promotor fue de 28.2%, un porcentaje que excede al 18% encontrado en CaCU (Kalantari y col. 2004), e idéntico al reportado en lesiones anales de alto grado (Wiley y col. 2005). En tres de las doce muestras (25%), las secuencias del promotor se observaron casi totalmente desmetiladas, un patrón muy similar al informado en lesiones de alto grado y carcinomas ano-genitales.

A pesar de la hipermetilación observada en la región promotora de dichas muestras, llama la atención que la posición 7862 se encontró casi totalmente desmetilada en todas las muestras, similar a lo reportado en estudios previos realizados en lesiones de cuello uterino y anales (Kalantari y col. 2004; Wiley y col. 2005). La isla CpG que se encuentra en la posición 7862 es parte del sitio de unión de E2 en el origen de replicación; las otras 5 islas que se encuentran entre las posiciones 31 a 58 del genoma son parte de los sitios de unión de Sp1 y E2 en el promotor E6 (Kalantari y col. 2004).

Se ha sugerido que la metilación del promotor favorece la carcinogénesis, debido a que impide que la proteína E2 se una al sitio y reprima a E6, con lo cual se asegura la continua expresión oncogénica viral, aun en lesiones que no han perdido E2 como consecuencia de interrupción genómica (Turán y col. 2006).

Los niveles de metilación en los segmentos analizados son similares o más altos que los reportados previamente en CaCU y anal (Turán y col. 2006; Kalantari y col. 2004; Wiley y col. 2005), lo cual sugiere que el VPH en la mucosa bucal presenta un carácter oncogénico similar al descrito en cérvix; sin embargo, conclusiones más definitivas acerca del rol de la metilación del ADN-VPH solo podrán alcanzarse a través de estudios con un mayor número de muestras, y que incorporen individuos sin cáncer bucal, que permitan una adecuada comparación.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a través de la presente investigación, permiten concluir que:

1. La asociación entre VPH-AR y el cáncer bucal encontrada, independientemente del uso de tabaco y alcohol, sugiere que los papilomavirus de alto riesgo juegan un papel importante en la carcinogénesis bucal.
2. La fuerte asociación entre el consumo de tabaco y alcohol y su interacción con el cáncer bucal, confirman resultados de estudios previos.
3. La presencia de cáncer bucal está posiblemente asociada con historia familiar de cáncer en primera línea en el grupo de estudio.
4. El número de parejas sexuales y el inicio temprano de vida sexual activa son variables asociadas con la presencia de VPH en los casos de cáncer bucal.
5. Las alteraciones epigenéticas identificadas en el genoma de VPH-16 son una característica de los procesos carcinogénicos, lo que sugiere una asociación causal del virus en la carcinogénesis de la mucosa bucal en los pacientes infectados con este tipo de VPH.
6. Los cambios epigenéticos encontrados en el genoma de VPH-16 son similares a los encontrados en VPH-16 de neoplasias de mucosa de cuello uterino y anal

PERSPECTIVAS

1. La fuerte asociación entre VPH-AR y cáncer bucal encontrada en el presente estudio permite sugerir el posible papel oncogénico del virus en el desarrollo de neoplasias malignas en la mucosa bucal. Sin embargo, factores como la carga viral, mutaciones de genes virales, así como su expresión, son factores que requieren ser analizados con detalle en estudios subsecuentes. La identificación de VPH-AR en mucosa bucal normal permitirá identificar individuos con alto riesgo de desarrollar CB, y en aquellos con lesiones pre-malignas, sugerirá un seguimiento más cercano y el establecimiento de medidas de intervención más tempranas.
2. El cepillado citológico es una herramienta útil en la realización de ensayos moleculares que requieren obtención de ADN de mucosas. La técnica de PCR permite conocer en poco tiempo y con gran sensibilidad, la presencia de VPH, y con el uso de oligonucleótidos específicos, de tipos de alto riesgo. Este sistema puede ser incorporado como mecanismo auxiliar para el establecimiento de planes de diagnóstico y tratamiento en individuos con alto riesgo de CB.
3. Debido a que en 16.1% de los casos no se registró historia de tabaco y alcohol, ni presencia de VPH en la mucosa bucal, es necesario considerar que ciertos factores no identificados pudieran estar asociados al cáncer bucal. En este sentido, la realización de estudios que involucren mecanismos genéticos y epigenéticos que pudieran estar involucrados en el proceso de transformación maligna son importantes.
4. La mayor proporción de casos de CB positivos a VPH se encontró entre los pacientes no fumadores; sin embargo, debido al tamaño reducido de la muestra analizada, no fue posible identificar alguna asociación. Aunque se han sugerido el posible efecto protector del tabaco contra la infección viral en la mucosa bucal, se requieren estudios que

caractericen de manera adecuada las dos vías sugeridas en la generación del cáncer bucal.

El conocimiento de la historia natural de la infección por VPH en la mucosa bucal solo podrá ser obtenido por medio de estudios de seguimiento, con el fin de identificar la prevalencia del virus en una cohorte de individuos sanos, y en aquellos que desarrollen lesiones premalignas y malignas.

5. La reciente incorporación de la vacuna tetravalente contra VPH en la población, y los anticuerpos producidos en los individuos inmunizados probablemente tendrá repercusiones en la prevalencia de VPH-AR en la mucosa bucal. La frecuencia de casos de cáncer bucal y orofaríngeo positivos a VPH-AR pudiera disminuir en las siguientes décadas como resultado de dicha inmunización.
6. Como ha sido descrito, el uso de tabaco y alcohol, así como la interacción entre ambos, son factores fuertemente asociados con la presencia de cáncer bucal y orofaríngeo. En el presente estudio se identificó además, que la dosis acumulativa del consumo de uno o ambos hábitos incrementa de manera significativa el riesgo de CB. Sin embargo, debido a que el consumo de estas sustancias no es constante durante toda la vida del individuo, y que pudieran haber interrupciones que no estén siendo incorporadas en el cálculo de las unidades consumidas, la medición de cotinina y otros biomarcadores plasmáticos pudieran ser de utilidad en la caracterización no solo de exposición directa a tabaco y alcohol, sino también a su papel como carcinógeno ambiental, específicamente en el caso del tabaco.
7. A pesar de que se identificó la asociación entre la historia familiar de cáncer (en primera línea) y el CB, es necesario considerar los sesgos a los que se enfrenta un estudio en el que se tiene que recurrir al recuerdo, y en el que la sola condición de casos puede generar una respuesta distinta a la de sus contrapartes sanos. En este sentido, la incorporación de

herramientas moleculares que permitan identificar patrones genéticos específicos, será de utilidad en la determinación del componente familiar de esta neoplasia maligna.

8. En los casos positivos a VPH se identificó un inicio temprano de vida sexual y un mayor número de parejas sexuales, lo que sugiere que la presencia de VPH en la mucosa bucal está relacionada con los hábitos sexuales y que probablemente, el contacto oro-genital pudiera actuar como vía de transmisión del virus. La realización de estudios que incorporen, además de cepillado de la mucosa bucal, muestras de la zona genital (cérvico-vaginal, uretral, peneana o testicular) permitirá establecer con mayor exactitud esta asociación.
9. En el presente estudio, las alteraciones epigenéticas observadas fueron consistentes a las reportadas con anterioridad en mucosas tan diferentes de la bucal como lo son la mucosa cervico-vaginal y la anal. Este hallazgo sugiere que el papel que juegan los papilomavirus en el cáncer bucal pudiera ser semejante al estudiado en CaCU y carcinoma anal, sitios en los que la integración del ADN viral al ADN del huésped favorecen el proceso oncogénico.
10. Debido a la reducida cantidad de ADN obtenida en cada paciente no fue posible analizar en el presente estudio la integración viral, lo cual hubiera permitido conocer de manera precisa el estado físico del virus y su relación con la metilación y el CB. En futuros estudios, esta variable deberá ser considerada detalladamente.
11. La determinación del estado de metilación del CB tiene un gran potencial en la detección temprana, monitoreo y tratamiento del CB. La creación de paneles de genes metilados en CB pudiera ser una herramienta importante en la identificación de pacientes con riesgo alto de desarrollar la neoplasia, con repercusiones en el diagnóstico oportuno y tratamiento precoz.

12. El conocimiento generado por estudios futuros que incluyan la determinación de metilación en genes asociados a CB, junto con los hallazgos sobre la metilación de VPH-16 en CB del presente estudio, podrá ser de utilidad en la incorporación de agentes desmetilantes en el tratamiento de CB, o en el establecimiento de márgenes quirúrgicos en neoplasias malignas de la mucosa bucal.

REFERENCIAS

- Abdelsayed RA (1991). Study of human papillomavirus in oral epithelial dysplasia and epidermoid carcinoma in the absence of tobacco and alcohol use. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **71**,730-732.
- Adams V, Schmid S, Zariwala M, Schmid M, Kleihues P, Briner J, Schäfer R (1999). Prevalence of human papilloma virus ADN in head and neck cancers carrying wild-type or mutant p53 tumor suppressor genes. *Anticancer Res* **19**,1-6.
- Aggelopoulou EP, Skarlos D, Papadimitriou C, Kitas C, Troungos C (1999). Human papillomavirus ADN detection in oral lesions in Greek population. *Anticancer Res* **19**,1391-1395.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**,3389-3402.
- Alvarez-Alvarez I, Sánchez-Lazo P, Ramos-González S, Rodrigo-Tapia JP, Núñez-Batalla F, Suárez-Nieto C (1997). Using polymerase chain reaction to human papillomavirus in oral and pharyngolaryngeal carcinomas. *Am J Otolaryngol* **18**,375-381.
- Anaya-Saavedra G, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho E, Zepeda-Zepeda M (2007). Oral and pharyngeal cancer mortality rates in Mexico, 1979-2003. *J Oral Pathol Med* (en prensa).
- Anderson JA, Irish JC, McLachlin CM, Ngan BY (1994). H-ras oncogene mutation and human papillomavirus infection in oral carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **120**,755-760.
- American Joint Comitee on Cancer (1997). *AJCC Cancer staging manual*, (Lippincott Williams and Wilkins). 5th Edition. Chicago.
- Arenas-Huertero F, Recillas-Targa F (2002). Modificaciones epigenéticas de la cromatina en la generación del cáncer. *Gac Med Mex* **138**,547-555.
- Aukerkari EI (2006). Methylation of tumor suppressor genes p16 (INK4a), p27 (Kip1) and E-cadherin in carcinogenesis. *Oral Oncol* **42**,5-13.
- Badal S, Badal V, Calleja-Macias IE, Kalantari M, Chuang LS, Li BF, Bernard HU (2004). The human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular ADN methylation. *Virology* **324**,483-492.
- Badal V, Chuang LS, Tan EH, Badal S, Villa LL, Wheeler CM, Li BF, Bernard HU (2003). CpG methylation of human papillomavirus type 16 ADN in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *J Virol* **77**,6227-6234.

Badaraco G, Venuti A, Morello R, Muller A, Marcante ML (2000). Human papillomavirus in head and neck carcinomas: prevalence, physical status and relationships with clinical/pathological parameters. *Anticancer Res* **20**,1301-1305.

Balaram P, Nalinakumari KR, Abraham E, Balan A, Hareendran NK, Bernard HU, Chan SY (1995). Human papillomaviruses in 91 oral cancers from Indian betel quid chewers--high prevalence and multiplicity of infections. *Int J Cancer* **61**,450-454.

Barasch A, Gofa A, Krutchkoff DJ, Eisenberg E (1995). Squamous cell carcinoma of the gingiva. A case series analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **80**,183-187.

Bernard HU (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* **32**,1-6.

Beutner KR, Tying S (1997). Human papillomavirus and human disease. *Am J Med* **10**,9-15.

Bhattacharjee B, Sengupta S (2006). CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology* **354**,280-285.

Boy S, Van Rensburg EJ, Engelbrecht S, Dreyer L, van Heerden M, van Heerden W (1989). HPV detection in primary intra-oral squamous cell carcinomas--commensal, aetiological agent or contamination? *J Oral Pathol Med* **35**,86-90.

Brandsma J, Burk RD, Lancaster WD, Pfister H, Schiffman M (1989). Inter-laboratory variation as an explanation for varying prevalence estimates of human papillomavirus infection. *Int J Cancer* **43**,260-262.

Bsoul SA, Huber MA, Terezhalmay GT (2005). Squamous cell carcinoma of the oral tissues: a comprehensive review for oral healthcare providers. *J Contemp Dent Pract* **6**,1-16.

Bunger MK, Archer TK (2004). Epigenetic mechanisms in tumorigenesis, en: *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*. (Robert A. Meyers ed). 2nd ed. pp.237-275. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.

Carbone M, Pass HI (2004). Multistep and multifactorial carcinogenesis: when does a contributing factor become a carcinogen? *Semin Cancer Biol* **14**,399-405.

Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Frias-Mendivil M, Solorza G, Lizano M (2004). Usefulness of combining universal oligonucleotides in detecting human papillomavirus in cervical cancer and premalignant lesions. *Salud Publica Mex* **46**,7-15.

Carvalho AL, Nishimoto I, Califano JA, Kowalski LP (2005). Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer* **114**,806-816.

Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Juan A, Monner A, Carrera M, Agudo A, Quer M, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S, Bosch FX (2004). The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer* **108**,741-749.

Centers for Disease Control and Prevention (1998). Preventing and controlling oral and pharyngeal cancer. Recommendations from a national strategic planning conference. *MMWR* **47**, RR-14.

Chang JY, Lin MC, Chiang CP (2003). High-risk human papillomaviruses may have an important role in non-oral habits-associated oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *Am J Clin Pathol* **120**,909-916.

Chang KW, Chang CS, Lai KS, Chou MJ, Choo KB (1989). High prevalence of human papillomavirus infection and possible association with betel quid chewing and smoking in oral epidermoid carcinomas in Taiwan. *J Med Virol* **28**,57-61.

Conway DI (2007). Each portion of fruit or vegetable consumed halves the risk of oral cancer. *Evid Based Dent* **8**,19-20.

Cooper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, Braakhuis BJ, de Vries N, van der Waal I (1995). Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otol Head Neck Surg* **121**,157-160.

Cortina LM (2001). Assessing sexual harassment among Latinas: development of an instrument. *Cultur Divers Ethnic Minor Psychol* **7**,164-181.

Cruz IB, Snidjers PJ, Steenbergen RD, Meijer CJ, Snow GB, Walboomers JM, van der Waal I (1996). Age-dependence of human papillomavirus ADN presence in oral squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol* **32**,55-62.

Chandu A, Smith ACH, Rogers SN (2006). Health-related quality of life in oral cancer: a review. *J Oral Maxillofac Surg* **64**,495-502.

Dai M, Clifford GM, le Calvez F, Castellsagué X, Snidjers PJF, Pawlita M, HerreronR, Hainaut P, Franceschi S (2004). Human papillomavirus type 16 and TP53 mutation in oral cancer: matched analysis of the IARC multicenter study. *Cancer Res* **64**,468-471.

Dahlgren L, Dahlstrand HM, Lindquist D, Högmo A, Björnestal L, Lindholm J, Lundberg B, Dalianis T, Munck-Wikland E (2004). Human papillomavirus is more common in base of tongue than in mobile tongue cancer and is a favorable prognostic factor in base of tongue cancer patients. *Int J Cancer* **112**,1015-1019.

de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJC, Meijer CJLM, Snijders PJ (1995). The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* **76**,1057-1062.

Doerfler W, Remis R, Muller K, Heller H, Hohlweg U, Schubbert R (2001). The fate of foreign ADN in mammalian cells and organisms. *Dev Biol* **106**,89-97.

Doorbar J (2005). The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* **32**,7-15.

D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML (2007). Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* **356**,1944-1956.

D'Souza G, Sugar E, Ruby W, Gravitt P, Gillison M (2005). Analysis of the effect of ADN purification on detection of human papillomavirus in oral rinse samples by PCR. *J Clin Microbiol* **43**,5526-5555.

El Mofty SK, Lu DW (2003). Prevalence of human papillomavirus type 16 ADN in squamous cell carcinoma of the palatine tonsil, and not the oral cavity, in young patients: a distinct clinicopathologic and molecular disease entity. *Am J Surg Pathol* **27**,1463-1470.

Esteller M (2000). Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of ADN repair genes. *Eur J Cancer* **36**,2294-2300.

Feinberg AP (2004). The epigenetics of cancer etiology. *Semin Cancer Biol* **14**,427-432.

Fioretti F, Bosetti C, Tavani A, Franceschi S, La Vecchia C (1999). Risk factors for oral and pharyngeal cancer in never smokers. *Oral Oncol* **35**,375-378.

Foulkes WD, Brunet JS, Sieh W, Black MJ, Shenouda G, Narod SA (1996). Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study. *BMJ* **313**,716-721.

Foulkes WD, Brunet JS, Kowalski LP, Narod SA, Franco EL (1995). Family history of cancer is a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer* **63**,769-773.

Fouret P, Monceaux G, Temam S, Lacourreye L, St Guily JL (1997). Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinomas in nonsmokers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **123**,513-516.

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

Franceschi S, Muñoz N, Bosch XF, Snidjers PJ, Walboomers JM (1996). Human papillomavirus and cancers of the upper aerodigestive tract: a review of epidemiological and experimental evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **5**,567-575.

Frias-Mendivil M, Zeichner-Gancz I, Sùchil-Bernal L, Ochoa-Carrillo FJ (1997). Epidemiología descriptiva del cáncer de cavidad bucal en el Instituto Nacional de Cancerología (1985-1992). *Rev Inst Nal Cancerol (Mex)* **43**,80-85.

Furrer VE, Benitez MB, Furnes M, Lanfranchi HE, Modesti NM (2006). Biopsy vs. superficial scraping: detection of human papillomavirus 6, 11, 16 and 18 in potentially malignant and malignant oral lesions. *J Oral Pathol Med* **35**,338-344.

García-Carrancá A, Gariglio PV (1993). Aspectos moleculares de los papilomavirus humanos y su relación con el cáncer cérvico-uterino. *Rev Inv Clin* **45**,85-92.

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D (2000). Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* **92**,709-720.

Gillison ML, Lowy DR (2004). A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer. *Lancet* **363**,1488-1489.

Giovannelli L, Campisi G, Lama A, Giambalvo O, Osborn J, Margiotta V, Ammatuna P (2002). Human papillomavirus ADN in oral mucosal lesions. *J Inf Dis* **185**,833-836.

Globocan. International Agency for Research on Cancer (2002). Globocan 2002 Database: Summary tables by cancer. Disponible en: <http://www-dep.iarc.fr>. Julio, 2007.

Gloss B, Bernard HU (1990). The E6/E7 promoter of human papillomavirus type 16 is activated in the absence of E2 proteins by a sequence-aberrant Sp1 distal element. *J Virol* **64**,5577-5584.

Goldenberg D, Harden S, Masayesva BG, Ha P, Benoit N, Westra WH, Koch WM, Sidransky D, Califano JA (2004). Intraoperative molecular margin analysis in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **130**,39-44.

Goldstein AM, Blot WJ, Greenberg RS, Schoenberg JB, Austin DF, Preston-Martin S, Winn DM, Bernstein L (1994). Familial risk in oral and pharyngeal cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol* **30**,319-322.

González-Moles MA, Ruiz-Avila I, González-Moles S, Martínez I, Ceballos A, Nogales F (1994). Detection of HPV-ADN by in situ hybridization in benign, premalignant and malignant lesions of the oral mucosa. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol* **37**,79-85.

Greene JC, Vermillion JR (1964). The simplified oral hygiene index. *J Am Dent Assoc* **68**,7-13.

Guerrero E, Daniel RW, Bosch FX, Castellsagué X, Muñoz N, Gili M, Viladiu P, Navarro C, Zubiri ML, Ascunce N (1992). Comparison of Virapap, southern hybridization, and polymerase chain reaction methods for human papillomavirus identification in an epidemiological investigation of cervical cancer. *J Clin Microbiol* **30**,2951-2959.

Ha PK, Califano JA (2006). Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. *Lancet Oncol* **7**,77-82.

Ha PK, Califano JA (2004). The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* **15**,188-196.

Hafkamp HC, Manni JJ, Speel EJ (2004). Role of human papillomavirus in the development of head and neck squamous cell carcinomas. *Acta Otolaryngol* **124**,520-526.

Halbert CL, Demers GW, Galloway DA (1991). The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol* **65**,473-478.

Hansson BG, Rosenquist K, Antonsson A, Wennerberg J, Schildt E, Bladström A, Andersson G (2005). Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol* **125**,1337-1344.

Haraf DJ, Nodzenski E, Brachman D, Mick R, Montag A, Graves D, Vokes EE, Weichselbaum RR (1996). Human papilloma virus and p53 in head and neck cancer: clinical correlates and survival. *Clin Cancer Res* **2**,755-762.

Hayden GF, Kramer MS, Horwitz RI (1982). The case-control study. A practical review for the clinician. *JAMA* **247**,326-331.

Hernández-Avila M, Garrido F, Salazar-Martínez E (2000). Biases in epidemiological studies. *Salud Publica Mex* **42**,438-436.

Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernandez L, Idris A, Sanchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snidjers PJ, Meijer CJ, Viscidi R, Muñoz N, Franceschi S (2003). Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* **95**,1772-1783.

Hidalgo-San Martin A, Caballero-Hoyos R, Celis-de la Rosa A, Rasmussen-Cruz B (2003). Validity and reliability of a questionnaire to asses the social, corporal, and sexual behaviors among school adolescents. *Salud Pub Mex* **45**,58-71.

Higa M, Kinjo T, Kamiyama K, Chinen K, Iwamasa T, Arasaki A, Sunakawa (2003). Epstein-Barr virus (EBV)-related oral squamous cell carcinoma in Okinawa, a subtropical island, in Southern Japan –simultaneously infected with human papillomavirus (HPV). *Oral Oncol* **39**,405-414.

Howie NM, Trigkas TK, Cruchley AT, Wertz PW, Squier CA, Williams DM (2001). Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Dis* **7**,349-354.

Ibieta BR, Lizano M, Frias-Mendivil M, Barrera JL, Carrillo A, Ma Ruiz-Godoy L, Mohar A (2005). Human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma in a Mexican population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **99**,311-315.

Issa JP (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. *Nature Rev* **4**,988-993.

Jefferies S, Eeles R, Goldgar D, A'Hern R, Henk JM, Gore M (1999). The role of genetic factors in predisposition to squamous cell cancer of the head and neck. *Br J Cancer* **79**,865-867.

Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ (2004). Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* **54**,8-29.

Jewell N (2000). Measures of Disease-Exposure Association, in *Statistics for Epidemiology*. (Ed. Chapman and Hall/CRC), pp. 33. Washington USA.

Johnson N (2001). Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ* **65**,328-339.

Kalantari M, Calleja-Macias IE, Tewari D, Hagmar B, Barrera-Saldana HA, Wiley DJ, Bernard HU (2004). Conserved methylation patterns of human papillomavirus-16 ADN in asymptomatic infection and cervical neoplasia. *J Virol* **78**,12762-12772.

Kashima HK, Shah F, Lyles A, Glackin R, Muhammad N, Turner L, Van Zandt S, Whitt S, Shah K (1992). A comparison of risk factors in juvenile-onset and adult-onset respiratory papillomatosis. *Laryngoscope* **102**,9-13.

Kim K, Garner-Hamrick PA, Fisher C, Lee D, Lambert PF (2003). Methylation patterns of papillomavirus ADN, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *J Virol* **77**,12450-12459.

Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Kolligs J, Jungehuelsing M, Eckel HE, Dienes HP, Pfister HJ, Fuchs PG (2001). Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 ADN in tonsillar carcinomas. *Cancer* **92**,2875-2884.

Koch WM, Lango M, Sewell D, Zahurak M, Sidransky D (1999). Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity. *Laryngoscope* **109**,1544-1551.

Koppikar P, de Villiers E, Mulherkar R (2005). Identification of human papillomaviruses in tumors of the oral cavity in an Indian community. *Int J Cancer* **113**,946-950.

Koskinen WJ, Chen RW, Leivo I, Makitie A, Back L, Kontio R, Suuronen R, Lindqvist C, Auvinen E, Molijn A, Quint WG, Vaheri A, Aaltonen LM (2003). Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* **107**,401-406.

Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S (2005). Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**,467-474.

Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RC, Gansler TS, Holland JF (2003). *Cancer Medicine*. (Emil eds) 6th ed. BC Decker Inc, Hamilton, Canada.

Kurose K, Terai M, Soedarsono N, Rabello D, Nakajima Y, Burk RD, Takagi M (2004). Low prevalence of HPV infection and its natural history in normal oral mucosa among volunteers on Miyako Island, Japan. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **98**,91-96.

Lawton G, Thomas S, Schonrock J, Monsour F, Frazer I (1992). Prevalence of genital human papillomavirus infections in normal oral mucosa: a comparison of methods for sample collection. *J Oral Pathol Med* **216**,265-269.

Lazcano-Ponce E, Salazar-Martínez E, Hernández-Ávila M (2001). Case-control studies: theoretical bases, variants and applications. *Salud Pub Mex* **43**,135-510.

Leyva-López AG, Aranda-Flores CE, Conde-González C, Lazcano-Ponce EC (2003). Low yield of HPV ADN determination in the distal región of the male urethra. *Salud Publica Mex* **45**,589-593.

Li W, Thompson CH, O'Brien CJ, McNeil EB, Scolyer RA, Cossart YE, Veness MJ, Walker DM, Morgan GJ, Rose BR (2003). Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous cell carcinoma of the tonsil. *Int J Cancer* **106**,553-558.

Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebersold DM (2001). Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx –a radiosensitive group of head and neck carcinoma. *Cancer* **92**,805-813.

List AJ, Patzel V, Zeidler U, Schopen A, Rühl G, Stollwerk J, Klock G (1994). Methylation sensitivity of the enhancer from the human papillomavirus type 16. *J Biol Chem* **269**,11902-11911.

Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA (2001). Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people—a comprehensive literature review. *Oral Oncol* **37**,401-418.

Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM (1989). Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells* **7**,209-214.

McLaughlin JK, Gridley G, Block G, Winn DM, Preston-Martin S, Schoenberg JB, Greenberg RS, Stemhagen A, Austin DF, Ershow AG (1988). Dietary factors in oral and pharyngeal cancer. *J Natl Cancer Inst* **80**,1237-1243.

Mellin H, Dahlgren L, Munck-Wikland E, Lindholm J, Rabrani H, Kalantari M, Dalianis T (2002). Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int J Cancer* **102**,152-158.

Mellin H, Friesland S, Lowensohn R, Dalianis T, Munck-Wikland E (2000). Human papillomavirus (HPV) ADN in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer* **89**,300-304.

Mesa-Cornejo VM, Barros-Núñez P, Medina-Lozano C (2006). Methylation of ADN: a marker for the diagnosis and prognosis in cancer. *Gac Med Mex* **142**,81-82.

Miller CS, Johnstone BM (2001). Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **91**,622-635.

Miller CS, White DK (1996). 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* **82**,57-68.

Mognetti B, Di Carlo F, Berta GN (2006). Animal models in oral cancer research. *Oral Oncol* **42**,448-460.

Molijn A, Kijer B, Quint W, van Doorn LJ (2005). Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* **32**,43-51.

Mork J, Lie AK, Glatre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela B, Moller B, Pukkala E, Schiller JT, Youngman L, Lehtinen M, Dillner J (2001). Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* **344**,1125-1131.

Mork J, Moller B, Glatre E (1999). Familial risk in head and neck squamous cell carcinoma diagnosed before the age of 45: a population-based study. *Oral Oncol* **35**,360-367.

Morris RE, Al Mahmeed BE, Gjorgov AN, Jazzaf HG, Rashid BA (2000). The epidemiology of lip, oral cavity and pharyngeal cancers in Kuwait 1979-1988. *Br J Oral Maxillofac Surg* **38**,316-319.

Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Kuh K (2004). Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* **78**,11451-11460.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snidjers PJ, Meijer CJ (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* **348**,518-527.

Negri E, Franceschi S, Bosetti C, Levi F, Conti E, Parpinel M, La Vecchia C (2000). Selected micronutrients and oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer* **86**,122-127.

Noble-Thopam SE, Fliss DM, Hartwick RW, McLachlin CM, Freeman JL, Noyek AM, Andrulis IL (1993). Detection and typing of human papillomavirus in verrucous carcinoma of the oral cavity using the polymerase chain reaction. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **119**,1299-1304.

Oda D, Bigler L, Lee P, Blanton R (1996). HPV immortalization of human oral epithelial cells: a model for carcinogenesis. *Exp Cell Res* **226**,164-169.

Ogi K, Toyota M, Ohe-Toyota M, Tanaka N, Noguchi M, Sonoda T, Kohama G, Tokino T. (2002). Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **8**,3164-3171.

Pagano JS, Blaser M, Buendia MA, Damania B, Khalili K, Raab-Traub N, Roizman B (2004). Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. *Semin Cancer Biol* **14**,453-471.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J (1999). Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* **80**,827-841.

Pavia M, Pileggi C, Nobile CG, Angelillo IF (2006). Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. *Am J Clin Nutr* **83**,1126-1134.

Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP (1997). Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer* **79**,595-604.

Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tetryakova N (2002). Tobacco smoke carcinogens, ADN damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* **21**,7435-7451.

Ponder BA (2001). Cancer genetics. *Nature* **411**,336-341.

Ramírez-Amador V, Esquivel-Pedraza L, Ochoa-Carrillo FJ, Cuapio-Ortiz A, Frias-Mendivil M, Meneses-Garcia A, Sanchez-Mejorada G (1995). Cancer of the mobile tongue in Mexico. A retrospective study of 170 patients. *Eur J Cancer B Oral Onco*, **31**,37-40.

Recillas-Targa F, De La Rosa-Velázquez IA, Soto-Reyes E, Benítez-Bribiesca L (2006). Epigenetic boundaries of tumour suppressor gene promoters: the CTCF connection and its role in carcinogenesis. *J Cell Med* **10**,554-568.

Remmerbach TW, Brinckmann UG, Hemprich A, Chekol M, Kündel K, Liebert UG (2004). PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. *J Clin Virol* **30**,302-308.

Resnick RM, Cornelissen MT, Wright DK, Eichinger GH, Fox HS, ter Schegget J, Manos MM (1990). Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by ADN amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst* **82**,1477-1484.

Rickards O, Scano G, Martinez-Labarga C, Taraborelli T, Gruppioni G, De Stephano GF (1995). Genetic history of the population of Puglia (southern Italy). *Gene Geogr* **9**,25-40.

Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klussmann JP, Turek LP, Haugen TH (2003). Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer* **104**,336-344.

Robertson KD (2005). ADN methylation and human disease. *Nature Rev* **6**,597-610.

Rodríguez-Dorantes M, Téllez-Ascencio N, Cerbón MA, López M, Cervantes A (2004). ADN methylation: an epigenetic process of medical importance. *Rev Inv Clin* **56**,56-71.

Ruesch MN, Laimins LA (1997). Initiation of ADN synthesis by human papillomavirus E7 oncoproteins is resistant to p21-mediated inhibition of cyclin E-cdk2 activity. *J Virol* **71**,5570-5578.

Sang BC, Barbosa MS (1992). Increased E6/E7 transcription in HPV 18-immortalized human keratinocytes results from inactivation of E2 and additional cellular events. *Virology* **189**,448-455.

Sankaranarayanan R, Ramadas K, Thomas G, Muwonge R, Thara S, Mathew B, Rajan B (2005). Effect of screening on oral cancer mortality in Kerala, India: a cluster-randomised controlled trial. *Lancet* **365**,1927-1933.

Schmidt BL, Dierks EJ, Homer L, Potter B (2004). Tobacco smoking history and presentation of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* **62**,1055-1058.

Scully C (2005). Oral cancer; the evidence for sexual transmission. *Br Dent J* **199**,203-207.

Scully C (2002). Oral squamous cell carcinoma: from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncol* **38**,227-234.

Scully C, Field JK, Tanzawa H (2000). Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, ADN repair and cell cycle control. *Oral Oncol* **36**,256-263.

Scully C, Porter S (2000). Oral cancer. *BMJ* **321**,97-100.

Schwartz JL (2000). Biomarkers and molecular epidemiology and chemoprevention of oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* **11**,92-122.

Schwartz SM, Yueh B, McDougall JK, Daling JR, Schwartz SM (2001). Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell cancer: a population-based study. *Otolaryngol Head Neck Surg* **125**,1-9.

Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madeleine MM, Mao EJ, Fitzgibbons ED, Huang S, Beckmann AM, McDougall JK, Galloway DA (1998). Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* **90**,1626-1636.

Sexton CJ, Proby CM, Banks L, Stables JN, Powell K, Navsaria J, Leigh IM (1993). Characterization of factors involved in human papillomavirus type 16-mediated immortalization of oral keratinocytes. *J Gen Virol* **74**,755-761.

Shiboski CH, Shiboski SC, Silverman S (2000). Trends in oral cancer rates in the United States, 1973-1996. *Community Dent Oral Epidemiol* **28**,249-256.

Shin KH, Park KH, Hong HJ, Oh JE, Choung PH, Min BM (2002). Prevalence of microsatellite instability, inactivation of mismatch repair genes, p53 mutation, and human papillomavirus infection in Korean oral cancer patients. *Int J Oncol* **21**,297-302.

Sisk EA, Soltys SG, Zhu S, Fisher SG, Carey TE, Bradford CR (2002). Human papillomavirus and p53 mutational status as prognostic factors in head and neck carcinoma. *Head Neck* **24**,841-849.

Sisk EA, Bradford CR, Jacob A, Yian CH, Staton KM, Tang G, Harris MO, Carey TE, Lancaster WD, Gregoire L (2000). Human papillomavirus infection in "young" versus "old" patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* **22**,649-657.

Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP (2004). Age, sexual behaviour and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* **108**,766-772.

Smith EM, Summersgill KF, Allen J, Hoffman HT, McCulloch T, Turek LP, Haugen TH (2000). Human papillomavirus and risk of laryngeal cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **109**,1069-1076.

Smith EM, Hoffman HT, Summersgill KS, Kirchner HL, Turek LP, Haugen TH (1998). Human papillomavirus and risk of oral cancer. *Laryngoscope* **108**,1098-1103.

Snidjers PJF, van den Brule AJC, Schrijnemakers HFJ, Raaphorst PM, Meijer CJ, Walboomers JM (1992). Human papillomavirus type 33 in a tonsillar carcinoma generates its putative E7 mRNA via two E6 transcript species which are terminated at different early region Poly(A) sites. *J Virol* **66**,3172-3178.

Steinberg BM, DiLorenzo TP (1996). A possible role for human papillomaviruses in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* **15**,91-112.

STROBE Group (2005). STROBE Statment. Checklist of essential items Version 3 (Sept 2005). Disponible en: <http://www.strobe.statement.org/PDF/STROBE-Checklist-Version3.pdf>. Julio, 2007.

Strome SE, Savva A, Brisset AE, Gostout BS, Lewis J, Clayton AC, McGovern R, Weaver AL, Persing D, Kasperbauer JL (2002). Squamous cell carcinoma of the tonsils: a molecular analysis of HPV associations. *Clin Cancer Res* **8**,1093-1100.

Sugerman PB, Shillitoe EJ (1997). The high risk human papillomavirus and oral cancer: evidence for and against a causal relationship. *Oral Dis* **3**,130-147.

Sugiyama M, Kumar Bhawal U, Dohmen T, Ono S, Miyauchi M, Ishikawa T (2003). Detection of human papillomavirus-16 and HPV-18 ADN in normal, dysplastic and malignant oral epithelium. *Oral Surg Oral Med Oral Radiol Oral Endod* **95**,594-600.

Summersgill KF, Smith EM, Kirchner HL, Haugen TH, Turek LP (2000). P53

polymorphism, human papillomavirus infection in the oral cavity, and oral cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **90**,334-339.

Syrjänen S (2005). Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virology* **32**,59-66.

Syrjänen K, Syrjänen S (1989). Concept of the existence of human papillomavirus ADN in histologically normal squamous cell epithelium of the genital tract should be re-evaluated. *Acta Obstet Gynecol Scand* **68**,613-617.

Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhönen S, Nuutinen J (1983). Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* **12**,418-424.

Tachezy R, Klozar J, Saláková M, Smith E, Turek L, Betka J, Kodet R, Hamsikova E (2005). HPV and other risk factor of oral cavity/oropharyngeal cancer in the Czech Republic. *Oral Dis* **11**,181-185.

Tarvainen L, Suuronen R, Lindqvist C, Malila N (2004). Is the incidence of oral and pharyngeal cancer increasing in Finland? An epidemiological study of 17 383 cases in 1953-1999. *Oral Dis* **10**,167-172.

Teraï M, Hashimoto K, Yoda K, Sata T (1999). High prevalence of human papillomaviruses in the normal oral cavity of adults. *Oral Microbiol Immunol* **14**,201-205.

Turan T, Kalantari M, Calleja-Macias IE, Villa LL, Cubie HA, Cuschieri K, Skomedal J, Barrera-Saldaña HA, Bernard HU (2006). Methylation of the human papillomavirus-18 L1 gene: a biomarker of neoplastic progression? *Virology* **349**,175-183.

Van Houten VM, Snijders PJ, van den Brekel MW, Kummer JA, Meijer CJ, Van Leeuwen B, Denkers F, Smele LE, Snow GB, Brakenhoff RH (2001). Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* **93**,232-235.

Viswanathan M, Tsuchida N, Shanmugam C (2003). Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* **105**,41-46.

Wallenius K, Lekholm U (1973). Oral cancer in rats induced by the water soluble carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide. *Odont Revy* **24**,39.

Watts DH, Koutsky LA, Holmes KK, Goldman D, Kuypers J, Kiviat N, Galloway DA (1998). Low risk of perinatal transmission of human papillomavirus: results from a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol* **178**,365-373.

Wiest T, Schwartz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX (2002). Involvement of HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRB cell cycle control. *Oncogene* **21**,1510-1517.

Wiley DJ, Huh J, Rao JY, Chang C, Goetz M, Poulter M, Masongsong E, Chang CI, Bernard HU (2005). Methylation of human papillomavirus genomes in cells of anal epithelia of HIV-infected men. *J Acquir Immune Defic Syndr* **39**,143-151.

Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA (2003). Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol* **157**,218-226.

World Health Organization (1992). *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, Vol. 1 (10th rev.)* Geneva, Switzerland.

Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* **14**,473-486.

Yeudall WA, Campo MS (1991). Human papillomavirus ADN in biopsies of oral tissues. *J Gen Virol* **72**,173-176.

Zakrzewska JM (1999). Oral cancer. *BMJ* **318**,1051-1054.

Zhang B, Laribee RN, Klemsz MJ, Roman A (1004). Human papillomavirus type 16 E7 protein increases acetylation of histone H3 in human foreskin keratinocytes. *Virology* **329**,189-198.

Zheng W, Blot WJ, Shu XO, Diamond EL, Gao YT, Ji BT, Fraumeni JF Jr (1992). Risk factors for oral and pharyngeal cancer in Shangai, with emphasis on diet. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **1**,441-448.

ANEXOS

Anexo 1a. Carta consentimiento (paciente CECB)

Infección por VPH como factor de riesgo para el desarrollo de cáncer bucal y sus patrones de infección. Estudio de casos y controles.
UAM-Xochimilco e INCan.

Yo _____ declaro que he sido informado que el Instituto Nacional de Cancerología (INCan), y la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM-X), están realizando un estudio para determinar la influencia de algunos factores de riesgo para el desarrollo de cáncer bucal (CECB) como las infecciones virales y otros agentes moleculares, además de tabaco y alcohol. Si los hallazgos del presente estudio mostraran una relación entre los factores mencionados, se podría profundizar en el conocimiento de la enfermedad, con el objetivo de establecer medidas más adecuadas para la prevención, diagnóstico y tratamiento.

Es de mi conocimiento que será visto en la consulta externa del Servicio de Cabeza y Cuello del INCan, donde especialistas en Medicina y Patología Bucal, me realizarán un cuestionario y un examen clínico completo. El interrogatorio incluirá preguntas con relación al consumo de tabaco y alcohol e higiene bucal.

Se me realizará un cepillado de la mucosa bucal, así como la toma de biopsia del lugar donde se localiza la lesión, después de la administración de un anestésico local. Una sección del tejido obtenido será utilizada para estudios de rutina, y la otra para la identificación del virus del papiloma humano (VPH). El ADN que se obtenga de cada una de estas pruebas solo será utilizado para los fines que contempla este estudio.

Se me ha informado que la realización de la biopsia puede provocar incómodo dolor facial, ocasionalmente sangrado porcutáneo y excepcionalmente infección local o alergia al anestésico. Todas las molestias que surjan por los procedimientos anteriormente descritos, serán atendidas por el especialista en Medicina y Patología bucal. Los resultados de los exámenes practicados me serán entregados a la brevedad posible en el consultorio del Servicio de Cabeza y Cuello del INCan. El cepillado de la mucosa bucal, no produce dolor ni causa eventos adversos.

Se me ha proporcionado información sobre los procedimientos que se me realizarán, así como sus posibles riesgos, molestias y beneficios. También se me ha informado que mi participación en el estudio no implica la administración gratuita de medicamentos que me serán indicados de acuerdo al criterio de los médicos del Servicio de Cabeza y Cuello del INCan.

Se ha hecho de mi conocimiento que no existirá ningún cargo para mí por las pruebas realizadas (toma de biopsia y cepillado diagnóstico), ni por las consultas adicionales para propósitos del estudio. El costo de las consultas o los procedimientos relacionados con mi perfeccionamiento de base y no relacionados con este estudio, correrán por mi cuenta de acuerdo a la clasificación socioeconómica que me ha asignado el Instituto.

Cualquier pregunta o duda que tenga sobre mi participación en el estudio, será contestada por la Dra. Gabriela Anaya Saavedra (56-76-94-04 y 044-55-23-33-41-57). Se me ha

garantizado que toda la información que se genere con esto es consignará en el expediente correspondiente. No será identificada información que provenga de este estudio.

ACEPTO LIBREMENTE TOMAR PARTE EN ESTE ESTUDIO, NEGARME APARTICIPAR EN EL O SUSPENDER MI MOMENTO QUE LO DECIDA. EN CASO DE QUE LO HAGA COMO PACIENTE RECIBO DE LA INSTITUCIÓN NO SE V

He leído la información anterior y comprendo los propósitos, beneficios y riesgos potenciales de mi participación en el estudio. Me permito preguntar mis dudas y todas las dudas serán respondidas por el personal informado, libre y voluntario para ser participante de este estudio. Copia de esta firma de consentimiento.

Fecha _____

Nombre del paciente _____

Dirección y teléfono _____

Firma del paciente _____

Nombre de testigo _____

Dirección y teléfono _____

Firma del testigo _____

Nombre de testigo _____

Dirección y teléfono _____

Firma del testigo _____

Nombre y firma del médico _____

Nombre y firma del investigador _____

Anexo 1b. Carta consentimiento (individuo control)

Infección por VPB como factor de riesgo para el desarrollo de cáncer bucal y sus patrones de mediación. Estudio de casos y controles.

UAM-Xochmilco, e INCAN.

Yo _____ declaro que He sido informado que el Instituto Nacional de Cancerología (INCan), y la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochmilco (UAM-X) están realizando un estudio clínico para determinar la influencia de algunos factores de riesgo para el desarrollo de cáncer bucal (CECB) como infecciones virales y algunos marcadores moleculares, además de tabaco y alcohol. Si los hallazgos del presente estudio mostraran una relación entre los factores mencionados, se podría profundizar en el conocimiento de la enfermedad, con el objetivo de establecer medidas más adecuadas para la prevención, diagnóstico y tratamiento.

Es de mi conocimiento que será visto en la consulta externa del Servicio de Cabeza y Cuello del INCAN, donde especialistas en Medicina y Patología Bucal me realizarán un cuestionario y examen clínico completo. El interrogatorio incluirá preguntas con relación al consumo de tabaco y alcohol e higiene bucal.

Se me realizará un cepillado de la mucosa bucal. Las células obtenidas en el cepillado citológico serán utilizadas para la extracción del ADN y posteriormente, la identificación del virus del papiloma humano (VPH) y de marcadores moleculares. El ADN que se obtenga de cada una de estas pruebas solo será utilizado para los fines que contempla este estudio.

El cepillado de la mucosa bucal no produce dolor ni conlleva ningún evento adverso. Sin embargo, en caso de que surjan molestias por el procedimiento anteriormente descrito, estas serán atendidas por el especialista en Medicina y Patología bucal. Los resultados de los exámenes practicados me serán entregados a la brevedad posible en el consultorio del Servicio de Cabeza y cuello del INCAN.

Se me ha proporcionado información sobre los procedimientos que se me realizarán, así como sus posibles riesgos, molestias y beneficios. También se me ha informado que mi participación en el estudio no implica la administración gratuita de medicamentos que me serán indicados de acuerdo al criterio de los médicos del Servicio de Cabeza y Cuello del INCAN.

Se ha hecho de mi conocimiento que no existirá ningún cargo para mí por las pruebas utilizadas (Cepillado citológico) ni por las consultas efectuadas para propósitos del estudio. Cualquier pregunta o duda que tenga sobre mi participación en el estudio, será contestada por la Dra. Gabriela Anaya Saavedra (56-76-94-04 y 044-55-54-70-97-71). Se me ha garantizado que toda la información que se obtenga con este estudio, será confidencial y se consignará en el expediente correspondiente. No será identificado en ninguna publicación o presentación que provenga de este estudio.

ACEPTO LIBREMENTE TOMAR PARTE EN ESTE ESTUDIO, SI QUE PUEDO NEGARME APARTICIPAR EN EL O SUSPENDER MI PARTICIPACIÓN EN EL MOMENTO QUE LO DECIDA. EN CASO DE QUE LO HAGA, LA ATENCIÓN

QUE COMO PACIENTE RECIBO DE LA INSTITUCIÓN, NO S
AFECTADA.

He leído la información anterior y comprendo los propósitos del p
beneficios y riesgos potenciales de mi participación en el estudio. He
de preguntar mis dudas y todas han sido aclaradas, por lo que d
informado, libre y voluntario para ser participante de este estudio. M
copia de esta forma de consentimiento

Fecha _____

Nombre del paciente _____

Dirección y teléfono _____

Firma del paciente _____

Nombre de testigo _____

Dirección y teléfono _____

Firma del testigo _____

Nombre de testigo _____

Dirección y teléfono _____

Firma del testigo _____

Nombre y firma del médico _____

Nombre y firma del investigador _____

DATA COLLECTION

Nome	Forma
Local de coleta	Extensão (m)
Tamanho	Características
Num. em	Cor
Superfície (m²)	

System: www.amsys.com

Improving the production

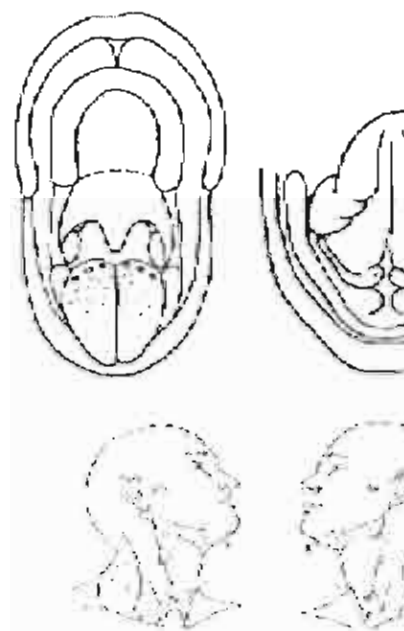
1. **Intensivierung der Produktion**
 2. **Erweiterung der Produktion**

4090243 : :

[illegible]

44-38861-10

10-040-043	DECLARACÃO: 1. NOME DO INTERESSADO: _____	10-040-043 1. NOME DO INTERESSADO: _____
	DECLARACÃO DO FISCAL: _____	DURACÃO DO MÍNIMO: _____
		DATA DE EMISSÃO: _____
	CATEGORIA: 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100. 101. 102. 103. 104. 105. 106. 107. 108. 109. 110. 111. 112. 113. 114. 115. 116. 117. 118. 119. 120. 121. 122. 123. 124. 125. 126. 127. 128. 129. 130. 131. 132. 133. 134. 135. 136. 137. 138. 139. 140. 141. 142. 143. 144. 145. 146. 147. 148. 149. 150. 151. 152. 153. 154. 155. 156. 157. 158. 159. 160. 161. 162. 163. 164. 165. 166. 167. 168. 169. 170. 171. 172. 173. 174. 175. 176. 177. 178. 179. 180. 181. 182. 183. 184. 185. 186. 187. 188. 189. 190. 191. 192. 193. 194. 195. 196. 197. 198. 199. 200. 201. 202. 203. 204. 205. 206. 207. 208. 209. 210. 211. 212. 213. 214. 215. 216. 217. 218. 219. 220. 221. 222. 223. 224. 225. 226. 227. 228. 229. 230. 231. 232. 233. 234. 235. 236. 237. 238. 239. 240. 241. 242. 243. 244. 245. 246. 247. 248. 249. 250. 251. 252. 253. 254. 255. 256. 257. 258. 259. 260. 261. 262. 263. 264. 265. 266. 267. 268. 269. 270. 271. 272. 273. 274. 275. 276. 277. 278. 279. 280. 281. 282. 283. 284. 285. 286. 287. 288. 289. 290. 291. 292. 293. 294. 295. 296. 297. 298. 299. 300. 301. 302. 303. 304. 305. 306. 307. 308. 309. 310. 311. 312. 313. 314. 315. 316. 317. 318. 319. 320. 321. 322. 323. 324. 325. 326. 327. 328. 329. 330. 331. 332. 333. 334. 335. 336. 337. 338. 339. 340. 341. 342. 343. 344. 345. 346. 347. 348. 349. 350. 351. 352. 353. 354. 355. 356. 357. 358. 359. 360. 361. 362. 363. 364. 365. 366. 367. 368. 369. 370. 371. 372. 373. 374. 375. 376. 377. 378. 379. 380. 381. 382. 383. 384. 385. 386. 387. 388. 389. 390. 391. 392. 393. 394. 395. 396. 397. 398. 399. 400. 401. 402. 403. 404. 405. 406. 407. 408. 409. 410. 411. 412. 413. 414. 415. 416. 417. 418. 419. 420. 421. 422. 423. 424. 425. 426. 427. 428. 429. 430. 431. 432. 433. 434. 435. 436. 437. 438. 439. 440. 441. 442. 443. 444. 445. 446. 447. 448. 449. 450. 451. 452. 453. 454. 455. 456. 457. 458. 459. 460. 461. 462. 463. 464. 465. 466. 467. 468. 469. 470. 471. 472. 473. 474. 475. 476. 477. 478. 479. 480. 481. 482. 483. 484. 485. 486. 487. 488. 489. 490. 491. 492. 493. 494. 495. 496. 497. 498. 499. 500. 501. 502. 503. 504. 505. 506. 507. 508. 509. 510. 511. 512. 513. 514. 515. 516. 517. 518. 519. 520. 521. 522. 523. 524. 525. 526. 527. 528. 529. 530. 531. 532. 533. 534. 535. 536. 537. 538. 539. 540. 541. 542. 543. 544. 545. 546. 547. 548. 549. 550. 551. 552. 553. 554. 555. 556. 557. 558. 559. 560. 561. 562. 563. 564. 565. 566. 567. 568. 569. 570. 571. 572. 573. 574. 575. 576. 577. 578. 579. 580. 581. 582. 583. 584. 585. 586. 587. 588. 589. 590. 591. 592. 593. 594. 595. 596. 597. 598. 599. 600. 601. 602. 603. 604. 605. 606. 607. 608. 609. 610. 611. 612. 613. 614. 615. 616. 617. 618. 619. 620. 621. 622. 623. 624. 625. 626. 627. 628. 629. 630. 631. 632. 633. 634. 635. 636. 637. 638. 639. 640. 641. 642. 643. 644. 645. 646. 647. 648. 649. 650. 651. 652. 653. 654. 655. 656. 657. 658. 659. 660. 661. 662. 663. 664. 665. 666. 667. 668. 669. 670. 671. 672. 673. 674. 675. 676. 677. 678. 679. 680. 681. 682. 683. 684. 685. 686. 687. 688. 689. 690. 691. 692. 693. 694. 695. 696. 697. 698. 699. 700. 701. 702. 703. 704. 705. 706. 707. 708. 709. 710. 711. 712. 713. 714. 715. 716. 717. 718. 719. 720. 721. 722. 723. 724. 725. 726. 727. 728. 729. 730. 731. 732. 733. 734. 735. 736. 737. 738. 739. 740. 741. 742. 743. 744. 745. 746. 747. 748. 749. 750. 751. 752. 753. 754. 755. 756. 757. 758. 759. 760. 761. 762. 763. 764. 765. 766. 767. 768. 769. 770. 771. 772. 773. 774. 775. 776. 777. 778. 779. 780. 781. 782. 783. 784. 785. 786. 787. 788. 789. 790. 791. 792. 793. 794. 795. 796. 797. 798. 799. 800. 801. 802. 80	

[illegible]

Anexo 3. Cuestionario sobre hábitos sexuales

Usted es:

- | | | |
|-------------------|------------------|----------------|
| • Casado () | • Soltero () | • Separado () |
| • Unión libre () | • Divorciado () | • Viudo () |

- ¿A que edad tuvo su primera relación sexual? _____
- ¿Con cuantas personas ha tenido relaciones sexuales en toda su vida? _____
- En el último año, ¿con cuantas personas ha tenido relaciones sexuales? _____

Usted prefiere tener relaciones sexuales con:

- Personas del sexo opuesto (Heterosexual) _____
- Personas de su mismo sexo (Homosexual) _____
- Personas del sexo opuesto y de su mismo sexo (Bisexual) _____

¿Cuándo ha tenido relaciones sexuales, usted ha tenido alguno de los siguientes contactos?

- | | | |
|---|--------|--------|
| - Contacto oro-genital (boca - genitales) | SI () | NO () |
| - Contacto oro-anal (boca - ano) | SI () | NO () |

Cuando tiene relaciones sexuales usted ha puesto:

- | | | | |
|---|--------|--------|--------------------------|
| 1. Su boca con los genitales de su pareja | SI () | NO () | Número de parejas: _____ |
| 2. La boca de su pareja con sus genitales | SI () | NO () | Número de parejas: _____ |

¿Cuándo tiene relaciones sexuales, usted o su pareja usan condón (preservativo)?

- | | | |
|---------------|--------------------|-------------------|
| • Siempre () | • Casi siempre () | • No recuerda () |
| • A veces () | • Nunca () | |

¿Usted tiene o tuvo alguna de estas enfermedades?

- | | | |
|---------------------------------|----------------------|---------------------------------------|
| 1. <u>Herpes genital o anal</u> | 2. <u>Condilomas</u> | 3. <u>Virus papiloma humano (VPH)</u> |
| Si () | Si () | Si () |
| No () | No () | No () |
| Tuvo () | Tuvo () | Tuvo () |
| No sabe () | No sabe () | No sabe () |

¿Su pareja (o parejas) tiene o tuvo alguna de estas enfermedades?

- | | | |
|---------------------------------|----------------------|---------------------------------------|
| 1. <u>Herpes genital o anal</u> | 2. <u>Condilomas</u> | 3. <u>Virus papiloma humano (VPH)</u> |
| Si () | Si () | Si () |
| No () | No () | No () |
| No sabe () | No sabe () | No sabe () |

Anexo 4. Áreas topográficas de la mucosa bucal

El examen bucal se llevará a cabo de acuerdo al siguiente orden topográfico:

1. Mucosa labial superior e inferior
Área de la mucosa bucal que se extiende del borde ventral hasta 1 cm de la parte más profunda del surco bucal y lateralmente a una línea trazada verticalmente a los ángulos de la boca.
2. Surco bucal superior e inferior
Área entre la línea mucogingival y una línea imaginaria que corre paralela y que está ubicada a 1 cm de la mucosa bucal.
3. Mucosa bucal derecha e izquierda
Parte interna de los caudales limitada por los surcos bucales superior e inferior y anteriormente por la mucosa labial.
4. Frenillo labial superior e inferior
Banda continua de tejido blando entre la línea media que une a la mucosa labial con la mucosa alveolar.
5. Paladar duro
Área triangular comprendida entre el proceso alveolar superior y limitado posteriormente por la unión con paladar blando.
6. Paladar blando
Área limitada en su parte anterior por la unión con paladar duro y en la parte posterior con los pilares anteriores, amígdalas e incluyendo la úvula.
7. Amígdalas
Tejido linfático localizado por detrás de los pilares anteriores del istmo de las fauces.
8. Base del dorso de la lengua
Área rectangular a la V lingual y entre los dos pilares posteriores.
9. Tercio medio lingual
Área triangular posterior a la punta de la lengua limitada atrás por el surco terminal y a los lados por los bordes laterales linguales.
10. Punta de la lengua
Área circular con un radio aproximadamente de 1 cm, ubicado en la parte más anterior de la mucosa.
11. Bordes laterales derecha e izquierda
Área rectangular que comienza posterior a la punta de la lengua, se extiende atrás y cubre un centímetro del borde dorsal y ventral de la lengua.

12. Superficie ventral de la lengua
Superficie inferior de la lengua, limitado lateralmente por los bordes laterales linguales y inferiormente por el piso de la boca.
13. Piso de boca
Área triangular cuyo vértice está localizado en el frenillo lingual y limitada por una línea formada por un área comprendida por la línea marginal que une a los caninos inferiores.
14. Frenillo lingual
Banda continua de tejido blando localizada en la línea media entre la punta de la lengua con el piso de la boca.
15. Encía libre
Parte coronaria no insertada que rodea al diente a modo de gingiva.
16. Encía adhérea
Limitada por la línea mucogingival y por la línea del surco.
17. Proceso alveolar superior e inferior

TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS.

- Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho E, Anaya-Saavedra G, García-Cuellar C, García-Carranca A. **Factores de riesgo asociados al cáncer bucal en pacientes mexicanos sin consumo de tabaco y alcohol.** VII Reunión de la Academia de patología y Medicina Bucal y IX Congreso de la SEMO. Barcelona, España, 11-15 octubre de 2007.
- Anaya-Saavedra G1, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho E, García-Cuellar C, García-Carranca A. **High risk HPV infection is associated with oral squamous cell carcinoma in Mexican patients: a case-control study.** 1st World Congress of the International Academy of Oral Oncology, Amsterdam, The Netherlands, 17-20 mayo 2007.
- Ramírez-Amador V, Anaya-Saavedra G, Irigoyen-Camacho E, Zepeda-Zepeda MA. **Trends in oral and oropharyngeal cancer mortality rates in Mexico, 1979-2003.** 1st World Congress of the International Academy of Oral Oncology, Amsterdam, The Netherlands, 17-20 mayo 2007.
- Adriana Balderas-Loaeza, Velia Ramírez-Amador, Gabriela Anaya-Saavedra, Mina Kalantari, Itzel Calleja-Macias, Hans-Ulrich Bernard, Ma. Esther Irigoyen-Camacho, Miriam Guido-Jimenez, Alejandro García-Carrancá. **Methylation patterns of the Long Control Region (LCR) of HPV-16 support a causal association of the virus with oral cancer.** 1st World Congress of the International Academy of Oral Oncology, Amsterdam, The Netherlands, 17-20 mayo 2007.
- Balderas-Loaeza A, Anaya-Saavedra G, Guido-Jiménez M, Méndez-Martínez R, Ramírez V, Irigoyen E, Kalantari M, Bernard HU, García-Carrancá A. **Los patrones de metilación de ADN en el VPH-16 sugieren una asociación causal del virus con el desarrollo de carcinoma de células escamosas de la cavidad oral.** 1^a Reunión Internacional de la Sociedad Mexicana del Virus del Papiloma A.C., Ciudad de México, 3-4 noviembre de 2006.

- Anaya-Saavedra G, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho E, García-Cuellar C, Balderas-Loaeza A, Rivera-Macias S, García-Carrancá A. **Infección por el Virus del Papiloma Humano como factor de riesgo para el desarrollo de cáncer bucal.** XIV Encuentro Nacional y V Iberoamericano de Investigación en Odontología, Veracruz, Ver., 18-20 octubre 2006. **Trabajo que obtuvo el Segundo Lugar.**
- Anaya-Saavedra G, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho E, García-Cuellar C, Méndez-Martínez R, Guido-Jiménez M, Luna-Ortiz K, Mosqueda-Taylor A, Hernández-Rodríguez P, García-Carrancá A. **Infección por VPH-16 y 18 y su asociación con otros factores de riesgo para cáncer bucal en México.** Congreso de la Academia Iberoamericana de Patología y Medicina Bucal. Guadalajara, Jalisco, 26 al 28 de septiembre de 2005.
- Anaya-Saavedra G, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho E, García-Cuellar C, Guido-Jimenez M, Mosqueda-Taylor A, García-Carrancá A. **Oral HPV infection in normal and oral squamous cell carcinoma affected tissues: Preliminary findings.** 22nd International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop 2005. Vancouver, Canadá, 30 de abril al 6 de mayo de 2005.
- Anaya-Saavedra G, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho E, García-Cuellar C, Guido-Jiménez M, Mosqueda-Taylor A, Luna OK, García-Carrancá A. **HPV infection in individuals with and without oral squamous cell carcinoma in Mexico.** 10th International Congress on Oral Cancer. Creta, Grecia, 19 al 24 de abril de 2005.

PUBLICACIONES

1. Anaya- Saavedra G, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, García-Cuellar C, Guido-Jiménez M, Méndez-Martínez R, García-Carrancá A. High association of Human Papillomavirus infection with oral cancer: a case control study in Mexico City. Arch Med Res (aceptado, agosto de 2007).
2. Anaya-Saavedra G, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, Zepeda-Franco M. Trends in oral and oropharyngeal cancer rates in Mexico, 1979-2003. J Oral Pathol Med 2007 (aceptado, mayo de 2007).
3. Balderas-Loaeza A, Anaya-Saavedra G, Ramírez-Amador V, Guido-Jiménez M, Kalantari M, Calleja-Macías I, Bernard HU, García-Carrancá A. Human papillomavirus-16 DNA methylation patterns support a causal association of the virus with oral squamous cell carcinomas. Int J Cancer 2007;120:2165-9.
4. Anaya-Saavedra IG. Rol de los papilomavirus en la carcinogénesis oral. En: Mosqueda-Taylor A. (Ed). Tópicos Selectos de Oncología Bucal. Clínicas Oncológicas de Iberoamérica. México: Ed. Intersistemas. 2007 (en prensa).

Original article

High association of Human Papillomavirus infection with oral cancer: a case control study in Mexico City.

Gabriela Anaya-Saavedra,¹ Velia Ramírez-Amador,¹ Ma. Esther Irigoyen-Camacho,¹ Claudia Ma. García-Cuellar,² Miriam Guido-Jiménez,³ Rocío Méndez-Martínez,² Alejandro García-Carrancá.^{2,3}

¹Universidad Autónoma Metropolitana; ²Instituto Nacional de Cancerología; ³Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Corresponding author:

Velia Ramírez-Amador.

Camino Sta. Teresa 277-9. Col. Parques del Pedregal

Mexico D.F. 14010

Phone: (5255) 5606-1781, fax: (5255) 5483-7206

Abstract

Background: The aim of the present study was to determine the association of High-Risk Human papillomavirus (HR-HPV) in Mexican individuals with oral squamous cell carcinoma (OSCC), and their association with various risk factors.

Methods: Matched case-control study. Cases were individuals with newly diagnosed OSCC, matched on sex and age with controls (1:4). Demographic and clinical data were obtained; a self administered questionnaire about sexual behaviour was filled. DNA from oral brushing was purified to amplify HPV-DNA through MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primers, and subsequently subjected to sequencing. Conditional regression models were built to calculate odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CI).

Results. Sixty-two cases and 248 controls (53.2% males), median age 62 (Q₁-Q₃=54-72) years, were included. HPV prevalence was 43.5% in cases and 17.3% in controls (HR-HPV: 37.1% cases, 9.7% controls). The most frequent types in cases were HPV-16 and HPV-18 (55.6% and 18.5%). The presence of HR-HPV was associated with OSCC (OR=6.2;95% CI:2.98-12.97) controlling for most common risk factors; an interaction between smoking and drinking was detected, and family history of cancer was also significant (OR:3.61; 95%CI=1.44–8.99). Early age at first sexual intercourse and large number of lifetime sexual partners showed an association with HR-HPV ($p=0.019$ and $p=0.033$, respectively).

Conclusions: Oral HR-HPV was strongly associated with OSCC, suggesting that HPV-16 and 18 are risk factors of oral cancer in Mexican patients. A significant association of tobacco and alcohol was confirmed. In addition, family history of cancer was associated with OSCC. The results underline the role of HPV in OSCC and its multifactorial etiology.

Key words: Human papillomavirus, oral cancer, tobacco, alcohol, Mexico.

Introduction

The causal association between consumption of tobacco and alcohol and the development of oral squamous cell carcinoma (OSCC) it is well established (1,2); however, a considerable proportion of OSCC occurs in non smokers and non drinkers, indicating the presence of other risk factors (3).

During the past two decades, it has been shown that Human Papillomavirus (HPV) infection is etiologically linked with a subset of Head and Neck Carcinomas (HNC) (4-8). The most common high risk HPV (HR-HPV) types found in cervical cancer, HPV-16 and 18, have also been identified in HNC (4,9).

The HPV prevalence reported in oral cancer studies have ranged from 3.9% to 74% (6,10). This large variations may be due to biological and methodological factors such as the anatomical site, the sampling collection techniques (frozen or fixed biopsies, scrapes or brushing of epithelial cells, or mouth wash) (11), and the use of different HPV detection assays with variations in sensitivity and specificity (12). Also, the sample size studied, the source of the cases, and the presence of environmental risk factors, probably influenced the discrepancies found among studies (13).

A worldwide analysis of 5046 HNC specimens from 60 studies of 26 different countries showed that 23.5% of 2642 oral cavity biopsy samples, were HPV positive (13). However, many of the studies included did not consider variables such as age, gender, smoking and alcohol drinking, and only a few included a control group (4,13).

In Mexico, a cross-sectional study carried out at the Instituto Nacional de Cancerología (INCan), showed that 42% of oral cancer cases were HPV positive; nevertheless, the lack of a control group in this study did not allow the identification of HPV prevalence in normal oral mucosa (14).

Considering the large variation of HPV prevalence among different populations in the world, the lack of a control group in many of the studies, the scarce evidence about OSCC aetiology in Mexico and particularly, the limited information on HPV, the aim of the present study was to determine the association of HR-HPV in Mexican individuals with oral cancer and their association with various risk factors.

Methods

Study design.

Matched case-control study, conducted from September 2003 to July 2006 at Instituto Nacional de Cancerología (INCan), Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, and Clínica Estomatológica “Rafael Lozano” of the Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, (UAM-X) in Mexico City. The Ethics Review Board of each institution approved the study. Every patient, who agreed to participate in the study, signed an informed consent. The design of the study was according to the STROBE statement recommendations for case-control studies (15).

Subjects.

Cases. Eligible cases were males or females aged 18 years or older, with newly diagnosed OSCC, histologically confirmed and prior to the application of any kind of therapy (chemotherapy, radiotherapy or surgery). Topographic locations included malignancies of the tongue, gingiva, floor of mouth, palate, buccal mucosa, and retromolar area (ICD-10 C01-06) and excluded lips cancer and malignant tumours of major salivary glands, nasopharynx, oropharynx and larynx (ICD-10 C00, C09-C14) (16). Sixty-two OSCC cases were selected, 33 were men (median age 60 years, range 31 to 83), and 29 women (median age 70 years, range 31 to 86). All patients were staged in agreement with the AJCC system of classification (17). None of the OSCC patients refused to participate in the study.

Controls. Four controls per each cancer case matched on age (± 5 years) and gender were included. They were free of any premalignant or malignant oral lesions and without personal history of cancer. Two controls were recruited from a medical service, and two from a dental service. The Hospital General “Manuel Gea González” and the Clínica Estomatológica “Rafael Lozano”, these two services as the INCan, that was the source of the cases, are governmental health services for subjects who do not have social security. All selected health services were located close to each other in the South of Mexico City. Exclusion criteria included mental illness that impaired the adequate consent process, personal history of any type of cancer, history or presence of premalignant or malignant oral lesions, a diagnosis associated with the exposure of interest, or subjects who refused to participate in the study (1.6%). Overall, matched controls were 248: 132 men (median age 59 years, range: 30-81 years), and 116 women (median age 67 years, range: 27-86 years).

Case and controls were interviewed by the same researcher who used a standardized questionnaire that contained demographic (age, gender, marital status, education and occupation), and clinical data (familiar history of cancer, and tobacco and alcohol consumption). In addition, OSCC cases were asked about their disease duration and signs and symptoms of their oral lesion. Data related with shape, size, colour and stage of the OSCC lesion were also obtained.

According to tobacco use, patients were classified as never, current and former smoker. Never smokers were individuals who reported had smoked less than one cigarette/day throughout their life. Current smokers were defined as subjects who had smoked at least one cigarette/day during the last year to the present. Former smokers were those individuals who had quit smoking at least 12 months prior to the study interview. Subjects were asked for the age of starting and ending to smoke, duration of the habit and number of cigarettes smoked per day. We calculated the cumulative amount of tobacco use in pack-years (number of cigarettes smoked a day/20 x 365.25 x years of smoking). The

smokers were classified in three categories according to their accumulate tobacco consumption: 0, <25, and ≥ 25 pack-years.

Alcohol exposure was quantified in terms of drink units (DU) per week; one DU corresponded to a glass of wine (125 ml), a bottle of beer (330 ml), or a glass of tequila or hard liquor (30 ml). Current drinkers were defined as those subjects who have drunk at least one DU weekly during the last year, non-drinkers were classified as subjects who never consumed alcohol or had less than one drink per week. Former users included drinkers who stopped alcohol use at least one year before the study entry. Participants were asked for the age of starting and stopping to drink and the number of DU per week. The cumulative amount of DU was calculated in DU-years (DU per week $\times$ 52 $\times$ years of drinking/365). Drinkers were classified in three categories: according to their accumulate alcohol consumption: 0, <16, and ≥ 16 DU-years.

Enrolled subjects were asked to fill a self administered questionnaire that included questions about life time number of sexual partners, age at first intercourse, oral-genital contact and number of oral-genital partners. Six cases (9.7%) and 17 controls (7.3%) refused to respond the questionnaire.

Oral samples.

An incisional biopsy was taken from all OSCC cases, one section was sent to a specialised laboratory for its histopathological examination and the other kept in a Falcon tube with 8 ml of PrecervCyt solution (*Cytoc Corporation, USA*) for HPV identification. Additionally, oral specimens were collected from OSCC lesions and matched mucosal site with controls, using a conical cytobrush. In order to avoid possible false negative results, three samples were taken with the cytobrush from the lesion in cases and oral mucosa in controls. Also, cytological samples were placed into 8 ml of PrecervCyt solution and stored frozen until testing.

For DNA extraction in biopsies, a 4 mm tissue section was cut, placed in microtube with nuclear lysis solution (*Wizard Genomic DNA Purification kit, Promega, Inc., Madison, WI*) and 17.5 μ l of proteinase K (20 mg/ml), and incubated at 65°C for 3 hours. Subsequently, all samples (biopsy specimens in the cases and cytobrush smears in cases and controls) were centrifuged at 2000 g and the supernatant was removed. DNA was purified using the Wizard Genomic DNA Purification kit (*Promega, Inc., Madison, WI*), according with the manufacturer's instructions, and quantified by spectrophotometry.

HPV DNA detection and typing.

Three types of controls were included in each reaction series, water (negative control), DNA of a HPV-18 positive HeLa cell line and HPV-16 positive CasKi cell line (positive controls). All control samples were prepared and analyzed in parallel with the clinical specimens, to ensure that proper reaction conditions were maintained. Standard precautions for PCR steps (sample preparation, reaction mix preparation, amplification and electrophoresis) were done in separate rooms.

The presence and quality of human genomic DNA was verified in all clinical samples by amplification of a 268 bp fragment of the β -globin gene by using the primers PCO4 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3') and GH20 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') (18). For the detection of HPV we used the general degenerate consensus primers MY09 (CGT CCM ARR

GGA WAC TGA TC), and MY11 (GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG; the degenerate base code was: M=A or C, W=A or T, Y=C or T, and R=A or G) which spans nucleotides 6722 to 7170 in HPV type 6 and the corresponding regions of the other genital HPVs (19). Also, oligonucleotides GP5+GP6+ that extent nucleotides 6764 to 6902 in HPV type 6 and the corresponding regions of other genital HPVs were used (20). PCR conditions included, preheating for 5 min at 94 °C followed by 40 cycles of 20 s at 94 °C, 20 s at 39 °C (GP5+/GP6+) or 55°C (MY09/MY11; Glob-F/Glob-R) and 40 s at 72 °C, and a final extension of 5 min at 72 °C. PCR was performed in a final volume of 20 µl, which consisted of 3 µl extracted DNA as a template (100 ng), 2 µl 10x PCR buffer, 1 U Taq polymerase (*Applied Biosystems*), 10 pmol each primer and 0.2 mM dNTPs. A 1.5 mM MgCl₂ concentration was used for all primers. DNA samples from case and control subjects were included randomly, blinded to clinical and demographic characteristics of samples. PCR was performed in a programmable thermal cycler (*Mastercycler® gradient, Eppendorf*). A 5 µl aliquot of the amplification mixture was analyzed by electrophoresis in 1.5 agarose gel and visualized by UV light after ethidium bromide staining.

Automated sequencing.

Positive PCR products were purified and subsequently sequenced in a programmable thermal cycler (*Mastercycler® gradient, Eppendorf*) using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (*Applied Biosystems*), by using one of the PCR oligonucleotides as a sequencing primer (GP5+ and MY09). The PCR mix and cycling conditions were used as recommended by the manufacturer. Sequence analysis was performed in the ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer System (*Applied Biosystems*). The obtained sequence was compared with the GenBank database (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) by using the BLAST program (21).

Statistical analysis.

Descriptive data for cases and controls were summarized with conventional central tendency statistics. Differences in demographic and clinical characteristics between high risk HPV (HR-HPV) positive and negative cases were calculated using the Chi-square test and the Fisher's exact test, when necessary. For dimensional variables, the Mann-Whitney U-test was applied. Univariate analysis between oral cancer and each risk factors under study was carried, and OR and its 95% confidence intervals (CI) were estimated, using conditional logistic regression models. The category of independent variable with assuming minimal level of risk of oral cancer was taken as reference. A two-sided *p* value less than 0.05 was considered significant.

To examine independence of the effects, multivariate logistic regression was performed by using conditional logistic regression functions. The criteria for selection of the variables entering the model were based on both biological plausibility and *p*-value less than 0.20 in the univariate analysis. A backward stepwise variable selection strategy was used to build a final model with a significant level ≥ 0.1 for removal and a significance level < 0.05 for re-entry into the model. Biologically meaningful interactions between OSCC and risk factors were also assessed for inclusion in the models. The STATA program v.8.0 (Stata Corporation LP, College Station TX, USA) was used for data analysis.

Results

Sixty-two cases and 248 controls (53.2% males) were included in the present study; the participants had a median age of 62 (Q_1 - Q_3 , 54-72) years. The distribution of cancer cases and controls according to sociodemographic characteristics is displayed in Table 1. The results of the conditional regression analysis showed that none of the selected variables were significant; marital status ($p=0.576$), level of education ($p=0.307$) nor occupation ($p=0.195$). The most frequently affected OSCC site was the tongue in 33 cases (53.2%), followed by the gingival in 12 cases (19.4%) and ten in floor of the mouth (16.1%); palate and buccal mucosa accounted jointly for seven of the OSCC cases (11.3%).

Table 2 shows the OR's and their 95% confidence intervals for those clinical variables which showed a significant association. Positive familiar history of cancer was associated with the presence of oral cancer (OR=4.16, 95% CI=2.1-8.1, $p<0.0001$). The odds ratios for oral cancer in individuals who were current smokers and drinkers were high (7.8 and 6.3, respectively), also high odds ratios were found when the cumulative amount of tobacco and alcohol consumption was analyzed.

As it is shown in Table 2, in cases, tobacco consumption was present in 32 (51.6%) and alcohol use in 21 (33.9%), both exposures were present in 15 (24.2%) cases. Two hundred and three individuals (65.5%) of the 310 participants were not exposed to any of these two risk factors (24 cases [38.7%] and 179 [72.2%] controls).

As described in Table 3, oral HPV infection was identified in 27 (43.5%) of the 62 cases and 43 (17.3%) of the 248 controls. Six HR-HPV types were detected in 23 cases (37.1%) and 24 controls (9.7%), of which four were more frequent in cases than in controls: HPV-16 (55.6% vs. 34.9%), HPV-18 (18.5% vs. 11.6%), HPV-33 (7.4% vs. 2.3%) and HPV-35 (3.7% vs. 0%). Two high risk HPV types were found in the controls but not in the cases, HPV-31 (4.7%) and HPV-52 (2.3%). In contrast, the frequency of low risk HPV types was lower in cases than in controls (HPV-1 [3.7% vs. 16.3%], HPV-2 [3.7% vs. 7.0%], HPV-6 [0% vs. 9.3%], HPV-13 [3.7% vs. 9.3%], with the exception of HPV-32, that was more frequent in the cases (3.7%) than in the controls (2.3%).

As shown in Table 3, an association between oral cancer with overall HPV (OR=3.41) and HR-HPV types (OR=6.21) was found. In contrast, low HPV types did not show an association with OSCC (OR= 0.83, $p=0.747$).

The conditional logistic regression analysis showed that familiar history of cancer, smoking, and alcohol consumption were associated with OSCC. An interaction was detected between alcohol and smoking (Table 4); for alcohol, distinct ORs were obtained in the strata of non-smokers, where the OR was 3.19, compared with the OR=28.44 in the strata of smokers (<25 pack-years). In addition, for tobacco consumption, in the strata of non-drinkers lower odds were shown (OR=2.65) compared with the odds of the strata of drinkers (OR= 34.29). Also, high risk HPV was independently associated with OSCC roughly a 6-fold increased odds ratio (Table 4). The presence of tobacco, alcohol and/or HR-HPV infection was identified in 52 (83.9%) of all cases in this study. Intriguingly, ten of the 62 patients with OSCC (16.1%) were negative to tobacco, alcohol use, and oral high risk papillomavirus infection; with a median age of 67.5 (Q_1 - Q_3 , 37-67) years, 6 (60%) were females.

Forty-six cases (74.2%) were in advanced stages of the disease (III and IV) and 30 (48.4%) showed well differentiated carcinomas. When cases were analyzed according to HR-HPV status, no statistical significant differences were found in regard to gender, age, clinical stage, histological grading, anatomical cancer location, and familiar history of cancer. The use of tobacco was higher among the cases who did not show HR-HPV in oral mucosa, but the difference was not significant (50.0% vs. 26.1%, $p=0.153$); as well, 14 of the 39 cases who were negative to HR-HPV were drinkers (35.9%), in contrast with 3 of the 23 (13.0%) positive cases ($p=0.023$). Thirteen of the 23 (56%) HR-HPV positive cases did not consume tobacco or alcohol; in contrast with 11 of the 39 (28.2%) HR-HPV negative cases ($p=0.027$).

The comparison of sexual behavior in OSCC cases according to HR-HPV status is shown in Table 5. The age at the first sexual intercourse and the number of lifetime sexual partners showed a statistical significant difference between the HR-HPV positive and negative oral cancer cases, the rest of variables revealed no significant differences between the two groups.

Discussion

The present study is the first case-control study of oral cancer performed in a Mexican population, its results showed a strong association between HR-HPV infection and OSCC, independently of tobacco and alcohol. Cases with oral HR-HPV infection had increased odds ratio (6-fold) for oral cancer, compared with controls.

A previous report in OSCC, completed in the same Mexican cancer referral center, as this study, showed a comparable HPV prevalence (42%). However, the earlier study did not include a control group and only estimated the proportion of HPV-16 positive cases (14).

The HPV prevalence in oral cancer found in the present study (43.5%) was in accordance with a recent population-based case-control study in Sweden, which informed that 40% of 131 oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas was HPV positive (22). In both studies, the identification of viral DNA sequences was performed with the same sets of primers, and under similar PCR and HPV-DNA sequencing conditions. In other reports, in which the HPV positivity has varied from 34.9% to 54.3% (23-26), there were some differences in the methods applied, such as the PCR primers used (23), or the use of specific oligonucleotides for HPV-16 and HPV-18 E6 gene (25).

Consistent with the 36% of HR-HPV positive oral cancer cases identified by Goran-Hansson *et al* (22), we found that 37.1% of the OSCC patients were positive for high risk papillomavirus. The most common HPV types detected were HPV-16 (55.6%), which is consistent with the majority of oral cancer reports (12,13), and followed by HPV-18 (18.5%), which was the second most common type in numerous reports (8,13,27).

The present study identified HPV as a risk factor for the development of oral cancer (OR=3.4), similar to an American case-control study that demonstrated an association (OR=3.0) of HPV infection and laryngeal cancer, after adjusting for age, smoking and alcohol consumption (28). Likewise, a meta-analysis of OSCC that analyzed independently 94 HPV-OSCC studies, found that oral HPV infection was 4.7-fold more likely to be detected in oral cancer, compared with normal oral mucosa (29). In addition, the findings of a number of well-controlled studies have demonstrated that HPV was associated with an increased risk of OSCC (3 to 7 times), independent of exposure to alcohol or tobacco (8,30). An earlier study recognized HPV-16 as a risk for the development of oral cancer (OR 6.2) in males (31), analogous to the OR 6.2 for HR-HPV found in this Mexican study.

The possible causal association of papillomavirus, particularly HPV-16, with HPV-DNA positive HNC has been supported by several studies (7,32,33), and confirmed by a recent nested case-control study in oropharyngeal cancer (4). Moreover, the evidence of hypermethylation of CpGs islands at the L1 region and part of the LCR of HPV-16 associated to OSCC, recently found by our group, suggests that HPV-16 genomes are chromosomally integrated in oral malignancies and it affects the host cells in a similar manner as in anogenital malignancies (34).

In the present study, the frequency of oral HR-HPV infection among controls was low (9.7%), consistent with most reports that have found a HR-HPV frequency that varies from 0.6 to 11.1%

(8,22,30,35-40). Nevertheless, the frequency of HR-HPV in normal mucosa has been reported as high as 36% (25), and 81.1%, when all HPV types have been analyzed (41). The detection of HPV in normal oral mucosa would suggest that not all HPV infections lead to malignancy; probably geographic and other exposure-related factors, as well as, behavioral aspects, play a role in the OSCC development (11).

Independent of HPV infection, we found that tobacco and alcohol use were strongly associated with OSCC, in agreement with a large number of studies (1,42,43), that have confirmed the role of these habits as strong oral cancer determinants. The different measurements of tobacco smoking and alcohol consumption analyzed in this study were associated with OSCC; also, the interaction detected between alcohol and smoking showed a noticeable impact in the odds of OSCC when both risk factors were present. The interaction found between alcohol and tobacco use, is in accordance with several studies that have demonstrated a synergic effect between the two habits, as risk factors for all upper aero digestive tract malignancies (1,42).

In addition, in the present study, the highest percentage of smokers and drinkers was found in the HPV negative HNC group, as it has been reported (4-7,44,45); in contrast, a number of studies have found no differences in smoking between HPV positive and negative patients (46,47). Whether there is a different carcinogenic pathway for HNSCC patients with HR-HPV compared with those cancers related to heavy tobacco and alcohol use is not clear, and more studies are needed in this area.

Two separate pathways of HNSCC development have been recently proposed, one suggests that carcinogenesis is mainly promoted by environmental factors such as tobacco and alcohol, and the other in which the oncogenic process is favored by HR-HPV (4,6,7). Accordingly, in our findings, in more than half of the HR-HPV positive OSCC cases (56%), there was a negative history of tobacco or alcohol consumption therefore these two factors could not explain the development of the oral malignancy in these patients. The precise contribution of HPV in the etiology of oral cancer remains to be determined, this is essential in order to establish possible preventive measures.

An association between oral cancer and a positive familiar history (first line relatives) of cancer was found in the present study. Various investigations have collected information on familiar background of cancer as a possible risk factor, but the results are inconclusive (4,48-50). It has been suggested that environmental factors could be responsible for the familiar effects observed, especially in tobacco related sites such as lung-oral cancer (49,51). In addition, it is necessary to consider the possibility of the presence of recall bias, frequently shared by case control studies, due to the fact that cases had a higher motivation to remember their cancer familiar history than the controls (52).

Epidemiologic studies have suggested that the oral exposure to HPV could be related to sexual behavior (53,54). Our data indicated that larger number of lifetime sexual partners and early age at first sexual intercourse were significantly associated with the presence of HR-HPV infection ($p=0.033$ and $p=0.019$, respectively). This finding is supported by other studies indicating that a high lifetime number of sexual partners and young age of first intercourse were associated with oral cancer, after adjusting for alcohol and tobacco exposure (4,5,8,53). Nevertheless, a potential limitation of the present study is the possibility that the sexual behaviors were underreported, due to

the personal nature of the questions.

It is important to highlight that in 10 (16.1%) of OSCC, we were unable to find any of the selected risk factors associated with their malignancy. Considering that oral carcinogenesis is a multi-step process of accumulated genetic damage (55), a number of unidentified factors could be associated as potential initiators and/or promoters of oncogenesis. Further research is needed to address other risk factors, such as genetic and epigenetic mechanisms that could be involved in malignant transformation.

The design of this case-control study allowed us to compare the presence of HR-HPV between the patients with cancer of the oral cavity and matched controls. Each case had four matched controls, and both groups of individuals came from comparable socio-demographic areas; also, a high participation rate was reached in both groups. In addition, all patients and controls were examined and interviewed by the same person, who was responsible for the collection of the laboratory samples.

Another strength of the study was the use of laboratory procedures for viral DNA detection with high sensitivity such as PCR, and the two sets of universal oligonucleotides (MY09/11 and GP5+/6+) that increased the viral detection boundary (56). The use of the second set of primers allowed us to retrieve a 10.3% (30 of 276) of positive samples (22.4% in cases and 8.4% in controls) which resulted negative with the only use of MY09/11. Also, suggested methods for contamination control were followed for all laboratory procedures (57). Although DNA sequencing allowed us the identification of a variety of HPV types (30), the future development of specific primers would permit the identification of missed HPV-types.

In conclusion, the results of this study have indicated that HR-HPV was strongly associated with oral cancer in a group of Mexican patients, suggesting that high-risk papillomavirus plays a role in oral carcinogenesis. Also, the important role of tobacco and alcohol as cancer determinants was confirmed, and an association of oral HR-HPV presence with sexual behavior was detected. The precise understanding of the oncogenic potential of HPV in HNC would need a deeper knowledge of the natural history of the virus in normal tissues; so, it would be useful to conduct cohort studies on HPV infection in the head and neck region that could allow us to characterize the persistence of HPV in normal and in transformed cells.

Acknowledgments

This research is the result of Dr. Anaya-Saavedra research project to obtain the PhD degree in the Doctorado en Ciencias Biológicas of the Universidad Autónoma Metropolitana. We are grateful to the surgeons, oncologists, dental surgeons and the Heads of Departments of INCAN, Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, and the Dental Clinic “Dr. Rafael Lozano” of UAM-Xochimilco, for its substantial contribution in the recruitment of the study participants. We also specially thank to Dr. Sergio Ponce-de-León-Rosales for his helpful comments on this project. The study was supported by a grant from CONACYT (no. 25987).

References

1. Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Amparo J, et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer* 2004;108:741-9.
2. Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2004;14:473-86.
3. Farshadpour F, Hordijk GJ, Koole R, Slootweg PJ. Non-smoking and non-drinking patients with head and neck squamous cell carcinoma: a distinct population. *Oral Dis* 2007;13:239-43.
4. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007;356:1944-56.
5. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D, et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2004;108:766-72.
6. Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1772-83.
7. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:709-20.
8. Schwartz 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 papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1626-36.
9. Nair S, Pillai MR. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. *Oral Dis* 2005;11:350-9.
10. Balaram P, Nalinakumari KR, Abraham E, Balan A, Hareendran NK, Bernard HU, et al. Human papillomaviruses in 91 oral cancers from Indian betel quid chewers--high prevalence and multiplicity of infections. *Int J Cancer* 1995;61:450-4.
11. Ha PK, Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:188-96.
12. Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virology* 2005;32:59-66.
13. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:467-75.
14. Ibieta BR, Lizano M, Frías-Mendivil M, Barrera JL, Carrillo A, Ma Ruiz-Godoy L, et al. Human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma in a Mexican population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:311-5.
15. STROBE Group. STROBE Statment. Checklist of essential items Version 3 (Sept 2005). Available at: <http://www.strobe.statement.org/PDF/STROBE-Checklist-Version 3.pdf>
16. World Health Organization. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems: 10th revision. Geneva: World Health Organization, 1992.
17. American Joint Committee on Cancer. AJCC Cancer staging manual, 5th Edition. Chicago: Lippincott Williams and Wilkins 1997.
18. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-4.
19. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells* 1989;7:209-14.
20. De Roda Husman AM, Walboomers JMM, van den Brule AJC, Meijer CJLM, Snijders PJF. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved

sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995;76:1057-62.

21. Altschul SF, Madden TL, Schäfer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res* 1997;25:3389-402.
22. Göran Hansson B, Rosenquist K, Antonsson A, Wennerberg J, Schildt E, Bladström A, et al. Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Oto-Laryngologica* 2005;125:1337-44.
23. Tachezy R, Klozar J, Salakova M, Smith E, Turek L, Betka J, et al. HPV and other risk factors of oral cavity/oropharyngeal cancer in the Czech Republic. *Oral Dis* 2005;11:181-5.
24. Chang JY, Lin MC, Chiang CP. High-risk human papillomaviruses may have an important role in non-oral habits-associated oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *Am J Clin Pathol* 2003;120:909-16.
25. Sugiyama M, Bhawal UK, Dohmen 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.
26. Cruz IB, Snidjers PJ, Steenbergen RD, Meijer CJ, Snow GB, Walboomers JM, et al. Age-dependence of human papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996;32:55-62.
27. Adams V, Schmid S, Zariwala M, Schmid M, Kleihues P, Briner J, et al. Prevalence of human papilloma virus DNA in head and neck cancers carrying wild-type or mutant p53 tumor suppressor genes. *Anticancer Res* 1999;19:1-6.
28. Smith EM, Summersgill KF, Allen J, Hoffman HT, McCulloch T, Turek LP, et al. Human papillomavirus and risk of laryngeal cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000;109:1069-76.
29. Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:622-35.
30. Smith EM, Hoffman HT, Summersgill KS, Kirchner HL, Turek LP, Haugen TH. Human papillomavirus and risk of oral cancer. *Laryngoscope* 1998;108:1098-103.
31. Maden C, Beckmann AM, Thomas DB, McKnight B, Sherman KJ, Ashley RL, et al. Human papillomaviruses, herpes simplex viruses, and the risk of oral cancer in men. *Am J Epidemiol* 1992;135:1093-102.
32. Smith EM, Ritchie JM, Pawlita M, Rubenstein LM, Haugen TH, Turek LP, et al. Human papillomavirus seropositivity and risks of head and neck cancer. *Int J Cancer* 2006;120:825-32.
33. Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 2002;21:1510-7.
34. Balderas-Loeza A, Anaya-Saavedra G, Ramirez-Amador VA, Guido-Jimenez MC, Kalantari M, Calleja-Macias IE, et al. Human papillomavirus-16 DNA methylation patterns support a causal association of the virus with oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2007;120:2165-9.
35. Furrer VE, Benitez MB, Furnes M, Lanfranchi HE, 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.
36. Koppikar P, de Villiers E, Mulherkar R. Identification of human papillomaviruses in tumors of the oral cavity in an Indian community. *Int J Cancer* 2005;113:946-50.
37. Kurose K, Terai M, Soedarsono N, Rabello D, Nakajima Y, Burk RD, et al. Low prevalence of HPV infection and its natural history in normal oral mucosa among volunteers on Miyako Island, Japan. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98:91-6.
38. Giovannelli L, Campisi G, Lama A, Giambalvo O, Osborn J, Margiotta V, et al. Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *J Inf Dis* 2002;185:833-6.
39. Mork J, Lie AK, Glatte E, Hallmans G, Jellum E, Koskela B, et al. Human papillomavirus

infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2001;344:1125-31.

40. Summersgill KF, Smith EM, Kirchner HL, Haugen TH, Turek LP. P53 polymorphism, human papillomavirus infection in the oral cavity, and oral cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;90:334-9.
41. Terai M, Hashimoto K, Yoda K, Sata T. High prevalence of human papillomaviruses in the normal oral cavity of adults. *Oral Microbiol Immunol* 1999;14:201-5.
42. Johnson N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dental Educ* 2001;65:328-39.
43. Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol* 2000;36:256-63.
44. Hafkamp HC, Speel EJ, Haesevoets A, Bot FJ, Dinjens WNM, Ramaekers FCS, et al. A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. *Int J Cancer* 2003;107:394-400.
45. Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klussmann JP, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer* 2003;104:336-44.
46. Sisk EA, Soltys SG, Zhu S, Fisher SG, Carey TE, Bradford CR. Human papillomavirus and p53 mutational status as prognostic factors in head and neck carcinoma. *Head Neck* 2002;24:841-9.
47. Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer* 1997;79:595-604.
48. Mork J, Moller B, Glatte E. Familial risk in head and neck squamous cell carcinoma diagnosed before the age of 45: a population-based study. *Oral Oncol* 1999;35:360-7.
49. Ankathil R, Mathew A, Joseph F, Nair MK. Is oral cancer susceptibility inherited? Report of five oral cancer families. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1996;32:63-7.
50. Goldstein AM, Blot WJ, Greenberg RS, Schoenberg JB, Austin DF, Preston-Martin S, et al. Familial risk in oral and pharyngeal cancer. *Oral Oncology European Journal Cancer* 1994;30B:319-22.
51. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KAAS. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people --a comprehensive literature review. *Oral Oncol* 2001;401-8.
52. Hernández-Avila M, Garrido F, Salazar-Martínez E. Biases in epidemiological studies. *Salud Publica Mex* 2000;42:438-6.
53. Scully C. Oral cancer; the evidence for sexual transmission. *Br Dent J* 2005;199:203-7.
54. Scully C. Oral squamous cell carcinoma: from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncol* 2002;38:227-34.
55. Carbone M, Pass HI. Multistep and multifactorial carcinogenesis: when does a contributing factor become a carcinogen? *Semin Cancer Biol* 2004;14:399-405.
56. Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Frías-Mendivil M, Solorza G, Lizano M. Usefulness of combining universal oligonucleotides in detecting human papillomavirus in cervical cancer and premalignant lesions. *Salud Publica Mex* 2004;46:7-15.
57. Boy S, Van Rensburg EJ, Engelbrecht S, Dreyer L, van Heerden M, van Heerden W. HPV detection in primary intra-oral squamous cell carcinomas--commensal, aetiological agent or contamination? *J Oral Pathol Med* 2006;35:86-90.

Table 1. Distribution of demographic characteristics among cases and controls

	Cases (n=62)		Controls (n=248)	
	n	(%)	n	(%)
<i>Marital status</i> ^a				
Married	35	(56.5)	152	(61.3)
Not married	27	(43.5)	96	(38.7)
<i>Schooling</i> ^a				
≤ 9 years	47	(75.8)	200	(80.6)
> 9 years	15	(24.2)	48	(19.4)
<i>Occupation</i> ^a				
Unemployed/retired	13	(21.0)	50	(20.2)
Housewives	25	(40.3)	81	(32.7)
Professionals	6	(9.7)	16	(6.5)
Technicians/shop workers	11	(17.8)	44	(17.8)
Clerks	3	(4.8)	30	(12.1)
Farmers and craftsmen	3	(4.8)	15	(6.0)
Elementary occupations	1	(1.6)	12	(4.8)

^a $p > 0.05$

Table 2. Conditional logistic odds ratios (OR) and 95% confidence interval for oral cancer of selected risk factors

	Cases (n=62)		Controls (n=248)		Crude OR	(95% CI)
	n	(%)	n	(%)		
<i>Familiar history of cancer</i>						
Negative	42	(67.7)	224	(90.3)	1.00	
Positive	20	(32.3)	24	(9.7)	4.16	(2.13 – 8.14)
<i>Tobacco consumption</i>						
Never	30	(48.4)	196	(79.0)	1.00	
Current	25	(40.3)	28	(11.3)	7.76	(3.60 – 16.72)
Former	7	(11.3)	24	(9.7)	2.22	(0.86 – 5.75)
<i>Tobacco consumption (pack-years)</i>						
None	30	(48.4)	196	(79.0)	1.00	
< 25	16	(25.8)	47	(19.0)	2.27	(1.01 – 5.13)
≥ 25	16	(25.8)	5	(2.0)	27.07	(7.67 – 95.58)
<i>Alcohol consumption</i>						
Never	41	(66.1)	218	(87.9)	1.00	
Current	17	(27.4)	16	(6.5)	6.33	(2.77 – 14.44)
Former	4	(6.5)	14	(5.6)	2.00	(0.60 – 6.70)
<i>Alcohol consumption (DU-years)</i>						
None	41	(66.1)	218	(87.9)	1.00	
< 16	9	(14.5)	16	(6.5)	2.11	(0.96 – 4.64)
≥ 16	12	(19.4)	14	(5.6)	38.55	(8.65 – 171.50)

Table 3. Conditional logistic odds ratios (OR) and 95% confidence interval for oral human papillomavirus

		Cases (n=62)	Controls (n=248)	Crude OR	(95% CI)
		n (%)	n (%)		
<i>Oral HR- HPV</i>					
	Negative	39 (62.9)	224 (90.3)	1.00	
	Positive	23 (37.1)	24 (9.7)	6.21	(2.98 – 12.97)
<i>Oral HPV</i>					
	Negative	35 (56.5)	205 (82.7)	1.00	
	Positive	27 (43.5)	43 (17.3)	3.41	(1.89 – 6.15)
<i>Oral low risk HPV</i>					
	Negative	58 (93.5)	229 (92.3)	1.00	
	Positive	4 (6.5)	19 (7.7)	0.83	(0.27 – 2.53)

Table 4. Conditional logistic regression adjusted odds ratios of selected risk factors for oral cancer

Variable		Adjusted OR ^a	(95% CI)	<i>p</i>
Familiar cancer history ^b				
No		1.00		
Yes		3.61	(1.44 – 8.99)	0.006
Oral HPV-HR				
Negative		1.00		
Positive		5.77	(2.41 13.81)	0.0001
Alcohol -tobacco (interaction) ^c				
Alcohol No	0 pack-years	1.00		
Alcohol Yes	0 pack-years	3.19	(1.14 8.90)	0.027
Alcohol No	< 25 pack-years	1.00		
Alcohol Yes	< 25 pack-years	28.44	(4.08 198.44)	0.001
Alcohol No	0 pack-years	1.00		
Alcohol No	< 25 pack-years	3.85	(1.24 11.959)	0.020
Alcohol Yes	0 pack-years	1.00		
Alcohol Yes	< 25 pack-years	34.29	(4.62 254.28)	0.01
Alcohol No	< 25 pack-years	1.00		
Alcohol No	≥ 25 pack-years	2.65	(0.57 12.39)	0.20
Alcohol No	0 pack-years	1.00		
Alcohol Yes	≥ 25 pack-years	10.21	(2.48 42.04)	0.001
Alcohol No	0 pack-years	1.00		
Alcohol Yes	< 25 pack-years	109.45	(16.80 713.07)	0.0001

^a Adjusted OR: odds ratios were derived from a conditional logistic regression model adjusted for all variables in the model, ^bFirst line relatives, ^c Estimates not provided for strata ≥25 pack-years and alcohol due to small sample in strata

Table 5. Sexual behavior in OSCC cases according with HR-HPV status

	HR-HPV-	HR-HPV+	<i>P</i>
<i>Median age at first sexual intercourse (Q₁-Q₃)</i>	19 (17 -19)	16 (15 – 18)	0.019 ^a
<i>Median lifetime sexual partners (Q₁-Q₃)</i>	3 (1– 4)	4 (2 – 7)	0.033 ^a
<i>Categorized lifetime sexual partners</i>	n (%)	n (%)	0.089 ^b
< 5	30 (88.2)	15 (68.2)	
≥ 5	4 (11.8)	7 (31.8)	
<i>Oral-genital contact</i>	n (%)	n (%)	0.126 ^b
Yes	8 (24.2)	9 (47.4)	
No	25 (75.8)	10 (52.6)	
<i>Lifetime oral-genital sexual partners</i>	n (%)	n (%)	0.131 ^b
None	24 (75.0)	10 (52.6)	
1 – 5	8 (25.0)	9 (47.4)	

^aU-Mann-Whitney. ^bFisher's exact test. Q₁-Q₃= Interquartile interval.

Oral and pharyngeal cancer mortality rates in Mexico, 1979–2003

Gabriela Anaya-Saavedra¹, Velia Ramírez-Amador¹, María Esther Irigoyen-Camacho¹, Araceli Zimbrón-Romero², Marco Antonio Zepeda-Zepeda¹

¹Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, México D.F.; ²Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud, Francisco de P. Miranda No. 177 5° piso, Lomas de Plateros, México D.F., México

BACKGROUND: In Mexico, information on oral and pharyngeal cancer (OPC) is scarce. The purpose of this study was to explore the trends in OPC mortality rates in Mexico from 1979 through 2003 and to describe the distribution of OPC deaths for selected socio-demographic variables for the period of 2001–2003.

MATERIAL AND METHODS: Annual crude and age-adjusted mortality rates were obtained by gender and site of lesion, using the 2003 WHO World standard million population. The Poisson regression model was used to detect a trend in the mortality rates, testing the hypothesis $\beta_1 = 0$. Also, the annual percentage change (APC) was computed over the age-adjusted rates.

RESULTS: The total number of OPC deaths during the period 1979–2003 was 15 576. The age-adjusted mortality rate was 1.13/100 000 in 1979 and 1.08/100 000 in 2003. Oral cancer was more frequently found than salivary gland and pharyngeal cancer (41.5% vs. 13.4% and 17.1%). The tongue (19%) was the most frequent oral affected site. The Poisson regression analysis indicated a stationary trend in cancer mortality rate; also, the APC regression model showed no increase or decrease in OPC from 1979 to 2003.

CONCLUSIONS: Oral and pharyngeal cancer mortality rates in Mexico were low compared to most countries, and remained stable in the past two decades.

J Oral Pathol Med (2007)

Keywords: Mexico; mortality rates; oral cancer

Introduction

Oral and pharyngeal cancer (OPC) represents a serious health problem, particularly in under developed coun-

tries, with an estimated of 484 628 cases in 2002 (1) and a global gender ratio (M:F) of 2.0:1 for mouth cancer, and 4.4:1 for oropharyngeal cancer (2).

There is a large geographical variation in oral cancer (OC) mortality. In the year 2000, OC mortality rates were exceedingly high in some South Central Asian countries and Melanesia, where the rates were between 19 and 22 per 100 000 inhabitants (1). In Africa, OC mortality rates have been as high as 14/100 000. In Europe, Slovakia and Hungary were the nations with the highest mortality rates (7 and 11 per 100 000). In America, OC mortality rates were high in Bolivia, Paraguay, Uruguay and Brazil, with rates between 3 and 4 per 100 000, whereas countries with lower mortality were El Salvador, Nicaragua and Ecuador, with mortality rates of 0.2, 0.5 and 0.7 per 100 000, respectively (1, 3).

In the last few decades, OPC mortality trends have increased in some countries of America, Asia and Europe (4–8). On the other hand, countries with high rates in the past, like Italy and France, show a decrease in OPC mortality rates for men (9), probably due to changes in alcohol and/or tobacco consumption (6).

In Mexico, information on OPC incidence and mortality rates is scarce. Data from a study conducted in an oncological referral center in Mexico City in the period from 1985 to 1992, have indicated that the cancer of the oral mucosa represents 5% of all malignancies (10). Recently, an analysis of Mexican cancer mortality rates for the periods 1970–1974 and 1995–1999, has shown that mortality rates of the mouth and pharyngeal malignancies in Mexico are low, compared with a majority of American and European countries (11). There is no information available, for the Mexican population that analyzes the cancer rate trends by anatomical sites of the oral and pharyngeal regions.

The purpose of this study was to explore the Mexican trend in OPC mortality rates over time (period 1979–2003) for the general population, considering gender and anatomical site, and to describe the distribution of OPC deaths for selected socio-demographic variables for the period from 2001 to 2003.

Correspondence: Velia Ramírez-Amador, Camino Sta. Teresa 277-9, Col. Parques del Pedregal, México D.F. 14010, México. Tel: (5255) 5606-1781, Fax: (5255) 5483-7206, E-mail: raval863@correo.xoc.uam.mx; veliaram@hotmail.com

Accepted for publication March 25, 2007

Materials and methods

The present study included all OPC deaths registered by the General Board of Health Information of the Mexican Health Ministry (SS) from 1979 to 2003. According to Mexican regulations, death certificates are routinely signed by a physician; this information is collected and reviewed by regional health authorities; and finally, it is incorporated into the National Registry Database of the National Institute of Statistics, Geography and Informatics (INEGI). In Mexico, death certificates do not include information regarding the histologic characteristics of the malignancies.

We used the Dynamic Search Service, based in Multidimensional on Line Analytical Processing (MO-LAP) technology of the National System of Health Information (SINAIS) of the SS to obtain the mortality data of the period from 1979 to 2003 (12). For the period 2001–2003, the database (13) includes information regarding age, marital status, level of education, occupation and health insurance coverage; these variables were not available for the previous years.

Oral and pharyngeal cancer was defined broadly, and included all anatomical sites corresponding to the lips, oral cavity and pharynx according to the codes of the 9th and the 10th International Classification of Diseases (14, 15) which cover the cancer of the lip (ICD-9 140, ICD-10 C00.0–C00.6 and ICD-10 C00.8–C00.9), the tongue (ICD-9 141, ICD-10 C01 and C02), the gum (ICD-9 143, ICD-10 C03), the floor of mouth (ICD-9 144, ICD-10 C04), the palate, and other parts of the mouth (ICD-9 145, ICD-10 C05 and ICD-10 C06) which include buccal mucosa, the retro molar area, and undetermined sites in the oral mucosa. In this study, major salivary gland cancer (ICD-9 142, ICD-10 C07 and C08) was excluded of the OC category and was presented as a separate anatomical site. The term pharyngeal cancer included nasopharynx, oropharynx, laryngopharynx and unspecified sites in oral or pharyngeal location (ICD-9 146–149, ICD-10 C09–C14).

For the statistical analysis, the software JMP 5.0 and STATA/SE8 Statistical Package (Stata Corporation, College Station, TX, USA) were used. Descriptive statistics were calculated to summarize the study data. Crude annual mortality rates were calculated for the period 1979–2003 by gender and by the site of the lesion, and were expressed per 100 000 inhabitants. A direct stan-

dardization process was applied to compare the age-adjusted annual mortality rates; the year 2003 World standard million population was used as the standard population. To identify the trend over time (1979–2003) for each site of OPC, a Poisson regression analysis was performed. A second regression analysis was carried out to study the trend of the annual percentage change (APC), using the natural logarithm of the rates and the calendar year as an independent variable, testing the hypothesis $\beta_1 = 0$.

Results

During the period of study (1979–2003), 15 576 deaths for OPC occurred: 10 462 (67%) in males and 5087 (33%) in females; in 27 cases, the gender was not specified. The average annual number of cases was 623, with 418 cases per year in men and 203 in women. The OPC crude mortality rate was 0.59 and 0.83 per 100 000, for the years 1979 and 2003, respectively, in men, crude mortality rates were 0.80 (1979) and 1.12 (2003), while in women they were 0.38 (1979) and 0.55 (2003), per 100 000.

The distribution of OPC deaths by age group and gender is presented in Table 1. Close to 30% of the deaths occurred in the 50- to 64-year-old group; a majority of the deaths were registered in the 65-year-olds and older groups. In the age group younger than 50-year-olds, the M:F ratio (1.6) was lower than the M:F ratio found in the 50- to 60-year-old group (2.2).

The distribution of OPC deaths by anatomical site and gender is shown in Table 2. Oral cancer cases represented the highest proportion (41.5%) of all OPC deaths; tongue cancer was the most frequent site affected, followed by other sites of the mouth and gingiva. Pharyngeal and salivary gland cancer deaths accounted for approximately 30%.

Trends in mortality rates

Figure 1 depicts the age-adjusted mortality rate, using the 2003 World standard million population for the period 1979–2003. In 1979, the age-adjusted mortality rate was 1.13 per 100 000 and 1.08 per 100 000 in 2003. The Poisson regression analysis on the age-adjusted rates indicated a stationary trend in OPC mortality ($\beta_1 = -0.00084$, $P > 0.10$); the analysis by sex also showed no significant change in trend over

Table 1 Distribution of oral and pharyngeal cancer deaths by age group and gender in Mexico, 1979–2003

Age group (years)	Female, n (%)	Male, n (%)	NS ^a , n (%)	Total, n (%)	M:F ^b
<19	83 (1.6)	144 (1.4)	—	227 (1.5)	1.73
20–39	325 (6.4)	447 (4.3)	2 (7.4)	774 (5.0)	1.38
40–49	460 (9.0)	788 (7.5)	3 (11.1)	1251 (8.0)	1.71
50–64	1237 (24.3)	3265 (31.2)	8 (29.6)	4510 (28.9)	2.64
65+	2962 (58.2)	5791 (55.3)	12 (44.4)	8765 (56.3)	1.96
NS ^a	20 (0.4)	27 (0.3)	2 (7.4)	49 (0.3)	1.35
Total	5087 (100.0)	10 462 (100.0)	27 (100.0)	15 576 (100.0)	2.06

^aNot specified.

^bMale-to-female ratio.

Table 2 Distribution of oral and pharyngeal cancer deaths by anatomical site and by gender in Mexico (1979–2003)

Site	Females, n = 5087, n (%)	Males, n = 10 462, n (%)	Total, n = 15 549, n (%)
Oral cancer	2268 (40.6)	4184 (40.0)	6452 (41.5)
Tongue	1068 (21.0)	1925 (18.4)	2997 (19.3)
Mouth others	718 (14.1)	1299 (12.4)	2023 (13.0)
Gingiva	254 (5.0)	374 (3.6)	628 (4.0)
Floor of mouth	103 (2.0)	357 (3.4)	461 (3.0)
Lip	125 (2.5)	229 (2.2)	354 (2.3)
Major salivary glands	777 (15.3)	1300 (12.4)	2077 (13.4)
Pharyngeal cancer	779 (15.3)	1883 (18.0)	2662 (17.1)
Oropharynx	292 (5.7)	880 (8.4)	1172 (7.9)
Laryngopharynx	247 (4.8)	543 (5.2)	790 (4.7)
Nasopharynx	240 (4.7)	460 (4.4)	700 (4.4)
Unspecified sites	1263 (24.8)	3095 (29.6)	4358 (28.0)

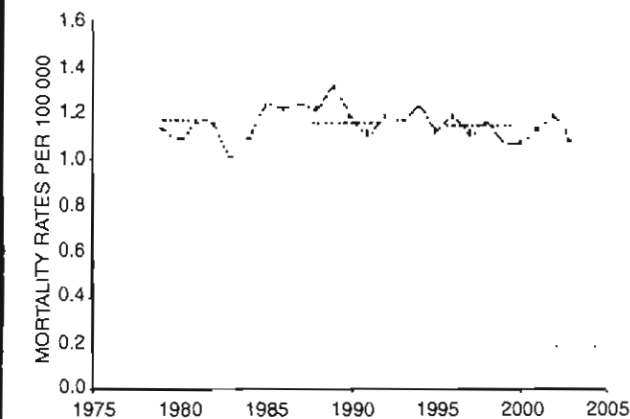


Figure 1 Age-adjusted trends for oral and pharyngeal cancer mortality rates, using the 2003 World standard million population.

time (females: $\beta_1 = -0.0011$, $P > 0.10$; males: $\beta_1 = -0.00005$, $P > 0.10$). In addition, the regression model applied to the APC showed a non-significant increase or decrease in OPC mortality in the studied period ($\beta_1 = -0.00078$, $P > 0.10$). Also, no significant upward or downward trend was identified by site (Fig. 2). Similarly, the Poisson regression analysis, in men and women, showed no significant change in trend in 1979, the age-adjusted rate was 1.45 for males and in 2003 it was 1.39 per 100 000, in females it was 0.77 per 100 000 in 1979 and 0.75 per 100 000 in 2003.

Socio-demographic characteristics

The socio-demographic characteristics of the OPC deaths (2001–2003) and the corresponding figures of the Mexican general population in the year 2000 are shown in Table 3. The information provided by the death certificates showed a poor educational profile of the cases; approximately 78% were illiterate or received elementary education, and only 6.7% of the subjects had a university degree. Regarding occupation, the group of OPC deaths showed a higher proportion of agricultural, fishers and machine operators than the data of the general Mexican population. When the analysis of occupation in the OPC deaths was done by gender, males were mainly craft, factory or agricultural workers (70%), while in

females the most frequent categories were housewife, retired or unemployed (87%).

Discussion

The current study represents the first analysis of OPC mortality trend in Mexico in a 25-year period; the data indicated that the mortality rates of OPC remained basically stable from 1979 to 2003.

In a previous study of cancer mortality in the Mexican population (11) that included OPC among other cancers, a slight upward trend of OPC was reported from the 1970s to the 1980s, which then leveled off during the 1990s. This previous study and the present one agree on the identification of low mortality rates of OPC in Mexico.

The OPC age-adjusted mortality rates found in the present study were lower (1.39/100 000 and 0.75/100 000 in males and in females, respectively, in 2003) than most countries in the world (1). According to a recent study that analyzed trends in cancer mortality in Latin America and the Caribbean (16) for the year 2000, the highest rates for OPC mortality in men were observed in Brazil, Cuba and Puerto Rico (5–6/100 000). Brazil and Cuba showed a growing tendency, probably associated with tobacco and alcohol consumption (5, 7, 17). In contrast, Colombia, Ecuador and Mexico presented the lowest rates in America for OPC mortality in men, with values around 1–2/100 000 (16). In the USA (18), Thailand (19) and some European countries (9, 20) the incidence of OPC has declined, probably due to the impact of tobacco-prevention campaigns.

More males than females are affected by OPC in the world (2, 10, 21, 22). In the current study, the male-female ratio was approximately 2:1. One of the possible reasons for this pattern is the differential distribution of smoking between males and females; in Mexico, 66.4% of the smokers are males and 33.6% are females (23). In addition, a study carried out in Mexico in a large group of population with health insurance showed that 22.2% of the men had experienced problems with their alcohol consumption and only 3.4% of the women (24). In some countries, like Uruguay and Brazil, the M:F ratio could be as high as 4:1 for OC and 10:1 for oropharyngeal cancer.

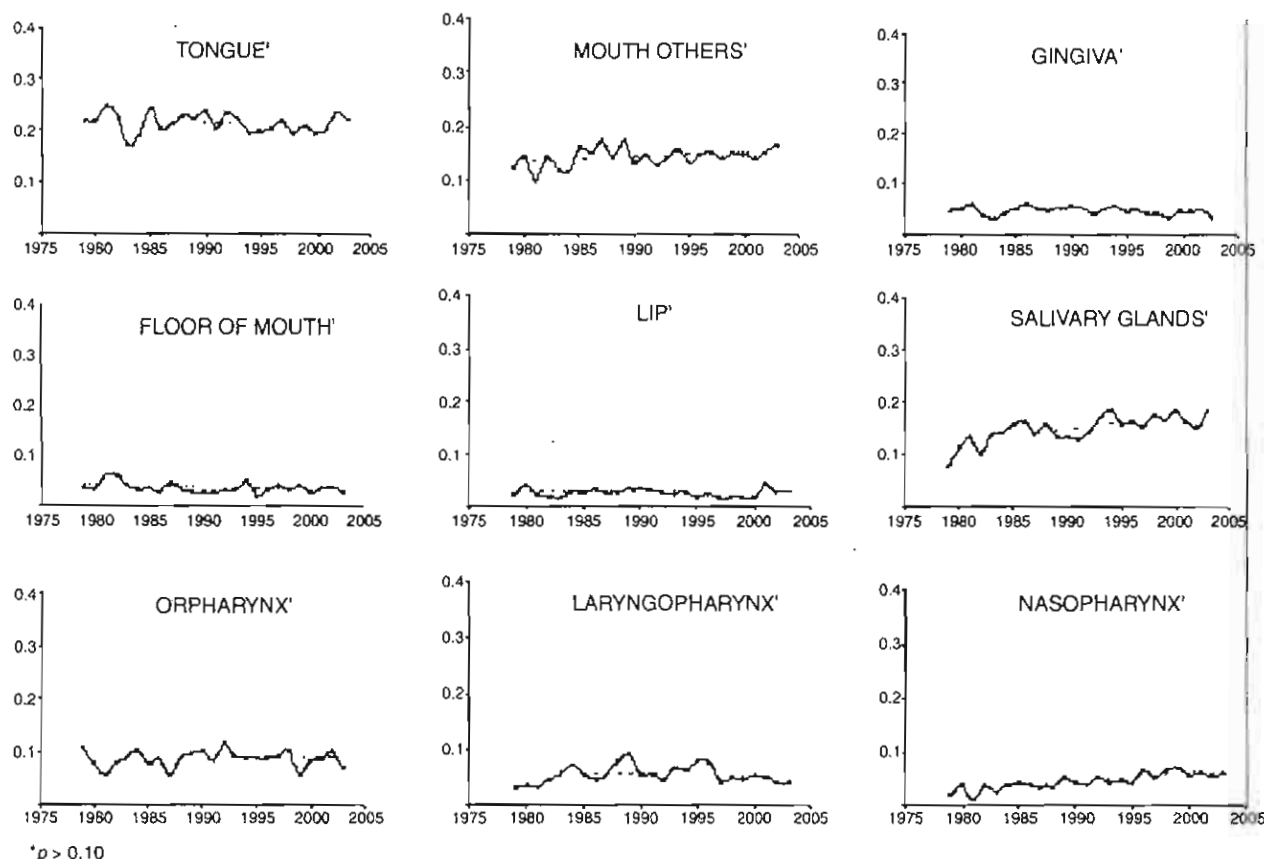


Figure 2 Trends in age-adjusted (2003 world population) rates per 100 000 habitants for selected sites in México during 1973–2003.

The mean age of death of OPC in Mexico was consistent with the average age recorded in a majority of the studies: OC is considered a disease that occurs primarily in males in their sixth and seventh decades of life (10, 21, 22, 25). Even though several studies have suggested that the incidence of OC in young people and females has increased (18, 26), we have not found a rise in OPC deaths in young people or in females.

A large percentage of the OPC deaths in 2000–2003 corresponded to individuals with a low level of education, without health insurance, and with low income occupations. It is important to underline that the proportion of illiterate individuals found in the present study was higher than the national proportion reported for Mexico (25% vs. 10%; 27). Our findings are consistent with some previous reports (28–30) that pointed out the association of deprivation with these malignances, suggesting that underprivileged subjects present lower survival rates and a worse prognosis than individuals with better a socio-economic profile.

In agreement with numerous studies (10, 18, 28, 31–34), the tongue was the most commonly affected anatomical site in the Mexican population. In contrast, in other epidemiologic studies of OC, the incidence trends carried out in Kuwait (35), in Finland and in Nova Scotia (20, 36), the nasopharynx and the lip were the most common affected sites.

Major salivary gland cancer was one of the most frequently affected anatomical sites in the Mexican population; other studies, in different countries, have reported similar findings (8, 35, 37). A case-series report and a case-control study have suggested that radiation and occupational exposure to rubber and nickel compounds are risk factors for the salivary gland cancer (38, 39). More studies are required to know of the etiological factors associated with the salivary gland cancer in Mexican groups.

In Mexico, OC mortality rates were higher than pharyngeal cancer mortality. This was in agreement with other studies from several populations of the world (Canada, Colombia, New Zealand, Germany, the United Kingdom, Switzerland, Finland, Singapore, Japan, Israel and India; 6), and in some areas of the USA (40). However, in other countries where the incidence of OPC is high, like northern France or Slovenia, pharyngeal cancer in men is equal or even more frequent than OC (6).

The definition of OPC is not uniform throughout studies in different areas of the world. In the present work, OC involved the lip, the tongue, the floor of the mouth, the palate, other parts of the mouth and major salivary glands. A number of authors have considered only some sites in the mouth (22, 28, 41); others have included oropharynx (4), and several studies have included mouth and pharynx cancer in the same

Table 3 Socio-demographic characteristics of oral and pharyngeal cancer deaths in Mexico (2001–2003), compared with the Mexican general population in 2000

	OPC deaths (n = 2557), n (%)	Mexican general population 2000 ²⁷ (%)
Marital status		
Married	1514 (59.2)	54.9
Single	451 (17.6)	40.8
Widower	547 (21.4)	4.3
Not specified	45 (1.8)	–
Schooling		
Illiterate	645 (25.3)	10.3
Primary school	1343 (52.5)	37.5
Middle school	189 (7.4)	24.4
High school	138 (5.4)	16.8
University	172 (6.7)	11.0
Not specified	70 (2.7)	–
Occupation		
Economically inactive population	1111 (43.4)	51.0
Skilled agricultural and fishers	564 (22.1)	7.5
Plant and machine operators	352 (13.8)	7.1
Technicians and office clerks	173 (6.8)	8.6
Service, shop and market workers	172 (6.7)	16.7
Professionals workers	71 (2.8)	4.5
Non-skilled occupations	34 (1.3)	3.2
Not specified	80 (3.1)	1.4
Health services coverage		
No	668 (26.1)	59.9
Yes	924 (36.1)	40.1
Not specified	965 (37.8)	–

category (5, 6, 8, 9). In contrast, other reports have excluded the lip, salivary glands, nasopharynx and hypopharynx (42, 43) or tonsils, lipo, naso and oropharynx (18, 31). Undoubtedly, it is necessary to take into account this aspect when comparing the results of different OPC studies.

Squamous cell carcinoma accounts for 90% of oral malignancies, as it has been shown in different series (21, 44). It would have been desirable to perform the analysis considering the histopathologic diagnosis of the tumors, but in Mexico death certificates do not include this information.

The reasons for the stable OPC trend found in the present analysis are not clear. One aspect to be considered is the smoking pattern experience in the Mexican population, data from National Addiction Surveys (23, 45) indicated that the prevalence of current smokers in people aged 12- to 65-year-olds living in urban areas of the country presented minor changes in the last decade: 25.8% in 1988, 25.1% in 1993, 27.7% in 1998 and 21.5% in 2000 (45, 46). The association of OPC with tobacco and/or consumption of alcohol was not analyzed in the present study, because this information was not registered in the death certificates or in the databases available. It could be hypothesized that the slight changes in smoking habit over time, have influenced the stable trends of OC observed during the study period.

Regardless of the low values and the stable pattern in OPC mortality rates found in the present study, it is

important to underline that in Mexico, most patients are diagnosed in late stages (III and IV; 10, 47). The prognosis is better for patients with early lesions compared with those in advanced stages of the disease (48). In addition, treatment at late stages is complex, costly and with a poor outcome (49); the OC management is mutilating and deleterious, producing in the patients physical, nutritional, social and psychological harmful consequences, besides affecting their quality of life (50, 51).

Routine use of oral visual screening for the reduction of OC mortality in high-risk groups has been recommended, based on the results of one randomized-controlled clinical trial, a 34% reduction in OC mortality was registered in tobacco or alcohol users in the intervention group compared with the control group (52). A nationwide study in Cuba has not shown conclusive results (17); however, a significant reduction in the incidence of advanced OC has been demonstrated (53, 54). At the present time, given the limited evidence, it is not clearly established that population-based oral screening reduces OC mortality (55, 56). Additional OC screening trials using rigorous methods are necessary, as well as the development of adjunctive molecular techniques to visual examination, for the identification of early oral lesions (57, 58).

Nevertheless, it is essential to highlight that OC is an easily detectable cancer during a medical or dental examination; health professionals, particularly dentists, have the responsibility of identifying pre-malignant and malignant lesions of the oral and pharyngeal tissues, especially in high-risk patients. In Mexico, the Official Mexican Norm for the prevention and control for oral diseases establishes periodic oral examination and the referral of patients with any suspicious oral lesion to a specialist (59). However, a positive impact of this norm is still to be seen. In addition, it is fundamental to improve community access to comprehensive information about OPC risk factors, signs and symptoms, in order to achieve an early diagnosis of oral and pharyngeal lesions. Considering that the consumption of tobacco and alcohol is the main risk factor associated with OPC, it is important that the dental profession should support efforts to reduce the continuance of these habits in their patients.

References

1. Globocan. *International Agency for Research on Cancer. Cancer Mondial Globocan 2002 Database: summary tables by cancer*. Available at: <http://www-dep.iarc.fr>, accessed on July 2006.
2. Parkin M, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 80: 827–41.
3. Wunsch-Filho V, de Camargo EA. The burden of mouth cancer in Latin America and the Caribbean: epidemiologic issues. *Semin Oncol* 2001; 28: 158–68.
4. Nieto A, Ruiz-Ramos M. Rising trends in oral cancer mortality in Spain, 1975–94. *J Oral Pathol Med* 2002; 31: 147–52.
5. Wunsch-Filho V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol* 2002; 38: 737–46.

6. Franceschi S, Bidoli E, Herrero R, Muñoz N. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: etiological clues. *Oral Oncol* 2000; 36: 106-15.
7. García-Jordán M, Lence-Anta JJ, Sosa-Rosales M, et al. Mortalidad del cáncer bucal en Cuba (1987-1996). *Rev Cubana Oncol* 1999; 15: 114-8.
8. Su W-Z, Tohrai I, Kawamura T, et al. Trends in site-specific mortality from oral and pharyngeal cancer among Japanese males, 1950-94. *Oral Oncol* 1999; 35: 9-16.
9. La Vecchia C, Lucchini F, Negri E, Levi F. Trends in oral cancer mortality in Europe. *Oral Oncol* 2004; 40: 433-9.
10. Frias-Mendivil M, Zeichner Gancz I, Sùchil-Bernal L, Ochoa-Carrillo FJ. Epidemiología descriptiva del cáncer de cavidad bucal en el Instituto Nacional de Cancerología (1985-1992). *Rev Inst Nal Cancerol (Mex)* 1997; 43: 80-5.
11. Malvezzi M, Bosetti C, Chatenoud L, et al. Trends in cancer mortality in Mexico, 1970-1999. *Ann Oncol* 2004; 15: 1712-8.
12. Secretaría de Salud. Información dinámica: Mortalidad. Sistema Nacional de Información en Salud. Available at: http://sinais.salud.gob.mx/cubos/id_mortalidad.html, accessed on July 2006.
13. Secretaría de Salud. Bases de datos de información sobre mortalidad. Sistema Nacional de Información en Salud. Available at: <http://sinais.gob.mx/mortalidad/mortalidad.htm>, accessed on July 2006.
14. World Health Organization. *International Statistical Classification of Disease*, 9th revision. Geneva: World Health Organization, 1977.
15. World Health Organization. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*, 10th revision. Geneva: World Health Organization, 1992.
16. Bosetti C, Malvezzi M, Chatenoud L, et al. Trends in cancer mortality in the Americas, 1970-2000. *Ann Oncol* 2005; 16: 489-511.
17. Fernandez-Garrote L, Herrero R, Ortiz-Reyes RM, et al. Risk factors for cancer of the oral cavity and oro-pharynx in Cuba. *Br J Cancer* 2001; 85: 46-54.
18. Shiboski CH, Shiboski SC, Silverman S Jr. Trends in oral cancer rates in the United States, 1973-1996. *Commun Dent Oral Epidemiol* 2000; 28: 249-56.
19. Reichart PA, Dietrich T, Khongkhunthian P, Srisuwan S. Decline of oropharyngeal cancer in Chiangmai province, Thailand, between 1988 and 1999. *Oral Oncol* 2000; 39: 569-73.
20. Tarvainen L, Suuronen R, Lindqvist C, Malila N. Is the incidence of oral and pharyngeal cancer increasing in Finland? An epidemiological study of 17,383 cases in 1953-1999. *Oral Dis* 2004; 10: 167-72.
21. Bsoul SA, Huber MA, Terezhalmay GT. Squamous cell carcinoma of the oral tissues: a comprehensive review for oral healthcare providers. *J Contemp Dent Pract* 2005; 6: 1-16.
22. Gorsky M, Epstein JB, Oakley C, et al. Carcinoma of the tongue: a case series analysis of clinical presentation, risk factors, staging and outcome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98: 546-52.
23. Olaiz G, Rojas R, Barquera S, et al. Encuesta Nacional de Salud 2000. Tomo 2. *La salud de los adultos*. Cuernavaca, Morelos, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2003.
24. Morales-García J, Fernández-Gárate I, Tudón-Garcés FM, Escobedo-de-la-Peña J, Zárate-Aguilar A, Madrazo-Navarro M. Prevalencia de consumo riesgoso y dañino de alcohol en derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Salud Publica Mex* 2002; 44: 113-21.
25. Conway DI, Stockton DL, Warnakulasuriya KAAS, et al. Incidence of Oral and Oropharyngeal cancer in United Kingdom (1990-1999) - recent trends and regional variation. *Oral Oncol* 2006; 42: 586-92.
26. Schantz SP, Yu GP. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with a special analysis for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 128: 268-74.
27. Instituto Nacional de Geografía, Estadística e Informática (INEGI). *Tabulados básicos: XII. Censo General de Población y Vivienda, 2000*. Tabulados Básicos: Aguascalientes, Ags., 2001.
28. Antunes JLF, Biazevic MGH, de Araujo ME, et al. Trends in spatial distribution of oral cancer mortality in Sao Paulo, Brazil, 1980-1998. *Oral Oncol* 2001; 37: 345-50.
29. Edwards DM, Jones J. Incidence of and survival from upper aerodigestive tract cancers in the U.K.: the influence of deprivation. *Eur J Cancer* 1999; 35: 968-72.
30. O'Hanlon S, Foster DP, Lowry RJ. Oral cancer in the North-East of England: incidence, mortality trends and the link with material deprivation. *Community Dent Oral Epidemiol* 1997; 25: 371-6.
31. Morelato RA, Lopez de Blanc SA. Oral cancer mortality in the province of Cordoba, Argentine Republic in the period 1975-2000. A comparative study with other populations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11: E250-5.
32. Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RCK. Tongue and tonsil carcinoma. Increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years. *Cancer* 2005; 103: 1843-9.
33. Canto MT, Devesa SS. Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in the United States, 1975-1998. *Oral Oncol* 2002; 38: 610-7.
34. Izarzugaza MI, Esparza H, Aguirre JM. Epidemiological aspects of oral and pharyngeal cancers in the Basque Country. *J Oral Pathol Med* 2001; 30: 521-6.
35. Morris RE, Mahmeed BE, Gjorgov AN, Jazzaf HG, Rashid BA. The epidemiology of lip, oral cavity and pharyngeal cancers in Kuwait 1979-1988. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2000; 38: 316-9.
36. Howell RE, Wright BA, Dewar R. Trends in the incidence of oral cancer in Nova Scotia from 1983 to 1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95: 205-12.
37. Lopes-Carvalho A, Nobuko-Nisimoto I, Califano JA, Kowalski LP. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer* 2005; 114: 806-16.
38. Beal KP, Singh B, Kraus D, Yahalom J, Portlock C, Wolden SL. Radiation-induced salivary gland tumors: a report of 18 cases and a review of the literature. *Cancer J* 2003; 9: 467-71.
39. Horn-Ross PL, Ljung BM, Morrow M. Environmental factors and the risk of salivary gland cancer. *Epidemiology* 1997; 8: 414-9.
40. Elter JR, Patton LL, Strauss RP. Incidence rates and trends for oral and pharyngeal cancer in North Carolina: 1990-1999. *Oral Oncol* 2005; 41: 470-9.
41. Moore SR, Jonson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of tongue cancer: a review of global incidence. *Oral Dis* 2000; 6: 75-84.
42. Mackenzie J, Ah-See, Thakker N, et al. Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology? *Oral Oncol* 2000; 36: 387-9.
43. Hindle I, Downer MC, Speight PM. The epidemiology of oral cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1996; 34: 471-6.

44. Massano J, Regateiro FS, Januario G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102: 67-76.
45. Olaiz-Fernández G, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, et al. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006*. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2006.
46. Tapia-Conyer R, Kuri-Morales P, Hoy-Gutiérrez MJ. An epidemiologic overview of smoking in Mexico. *Salud Pub Mex* 2001; 43: 478-84.
47. Ramírez-Amador V, Esquivel-Pedraza L, Ochoa-Carrillo FJ, et al. Cancer of the mobile tongue in Mexico. A retrospective study of 170 patients. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 1995; 31: 37-40.
48. Mignogna MD, Fedele S, Lo Russo L, Ruoppo E, Lo Muzio L. Costs and effectiveness in the care of patients with oral and pharyngeal cancer: analysis of a paradox. *Eur J Cancer Prev* 2002; 11: 205-8.
49. Mignogna MD, Fedele S. Oral cancer screening: 5 minutes to save a life. *Lancet* 2005; 365: 1905-6.
50. Chandu A, Smith ACH, Rogers SN. Health-related quality of life in oral cancer: a review. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 64: 495-502.
51. Schliepake H, Jamil MU. Prospective evaluation of quality of life after oncologic surgery for oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31: 427-33.
52. Sankaranarayanan R, Ramadas K, Thomas G, et al. Effect of screening on oral cancer mortality in Kerala, India: a cluster-randomised controlled trial. *Lancet* 2005; 265: 1027-33.
53. Sankaranarayanan R, Fernandez Garrote L, Lence Anta J, Pisani P, Rodriguez Salva A. Visual inspection in oral cancer screening in Cuba: a case-control study. *Oral Oncol* 2002; 38: 131-6.
54. Santana JC, Delgado L, Miranda J, Sánchez M. Oral cancer case finding programme (OCCFP). *Oral Oncol* 1997; 33: 10-2.
55. Kujan O, Glenny AM, Oliver RJ, Thakker N, Sloan P. Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 3: CD004150.
56. Allison P. Effectiveness of screening for oral cancer not proven. *Evid Based Dent* 2004; 5: 40-1.
57. Kujan O, Glenny A, Sloan P. Screening for oral cancer. *Lancet* 2005; 366: 1265-6.
58. Mignogna MD, Fedele S, Ruoppo E, Lo Russo L. The role of molecular techniques in preventing oral cancer and improving its poor prognosis: an illusion? *J Oral Pathol Med* 2002; 31: 246-8.
59. Secretaría de salud. Norma Oficial Mexicana para la Prevención y Control de las Enfermedades Bucales (NOM-013-SSA-1994). Available at: http://hgm.salud.gob.mx/servmed/norm_norm.html, accessed on May 2006.

Human papillomavirus-16 DNA methylation patterns support a causal association of the virus with oral squamous cell carcinomas

Adriana Balderas-Loeza^{1,2}, Gabriela Anaya-Saavedra^{2,3}, Velia A. Ramirez-Amador³, Miriam C. Guido-Jimenez⁴, Mina Kalantari⁵, Itzel E. Calleja-Macias⁵, Hans-Ulrich Bernard^{5*} and Alejandro Garcia-Carranca^{2,4}

¹Facultad de Quimica, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

²División de Investigación, Instituto Nacional de Cancerología-SS, México D.F., México

³Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F., México

⁴Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

⁵Department of Molecular Biology and Biochemistry, University of California Irvine, Irvine, CA

Infection with human papillomavirus-16 (HPV-16) is the cause of most anogenital carcinomas. This virus is also detected in about 20% of all head and neck squamous cell carcinomas. While there is strong evidence for a causal etiological role in the case of tonsillar carcinomas, causal association with malignant lesions of the oral cavity is not yet conclusive. Our previous investigations of HPV-16 DNA methylation in anogenital sites have identified hypermethylation of the L1 gene and part of the long control region in many malignant lesions, but rarely in asymptomatic infections and low-grade precancerous lesions. Here, we report hypermethylation of this diagnostically important segment of the viral DNA in 10 out of 12 HPV-16 positive oral carcinomas from Mexican patients. These data indicate epigenetic changes of HPV-16 in oral carcinomas similar to those in anogenital carcinomas, suggesting carcinogenic processes under the influence of HPV-16 in most if not all of these oral malignant lesions.

• 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key words: papillomavirus; carcinoma; head and neck cancer; oral cavity; DNA methylation; DNA recombination; etiology; progression; HPV-16

Infection with human papillomaviruses (HPVs), notably with high-risk HPV types such as HPV-16 and 18, is a necessary step in the etiology of anogenital cancers, specifically carcinoma of the cervix uteri. This notion is based on epidemiological research that identified a high relative risk of carcinogenic progression associated with high-risk HPV infection, DNA diagnosis that confirmed the presence and transcription of HPV genomes in all cervical carcinomas, and the study of HPV oncoproteins that catalyze a variety of molecular mechanisms that convert normal into malignant cells.^{1–6} In case of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs), an HPV dependent etiology is not as consistently confirmed as in anogenital cancers. Approximately 80% of all HNSCCs do not contain HPV genomes, and must therefore originate from HPV independent etiological processes, likely including mutational events triggered by tobacco and alcohol consumption. However, there is extensive evidence that a proportion of all HNSCCs contain DNA of high-risk HPV types.^{7–14} Among head and neck sites, squamous cell carcinomas of the tonsils have the strongest statistical support for an HPV dependent etiology.^{9,15–17} There is less strength and consistency for a linkage between HPV infection and carcinogenesis at sites of the oral mucosa such as tongue, palate, floor of mouth and gingiva. Nevertheless, epidemiological studies have established statistical evidence for a causal association of HPVs and malignancies even for these oral sites.^{9,16} In addition, analysis of some HPV containing oral carcinomas revealed recombination between HPV genomes and cellular DNA as well as HPV oncogene expression,^{18–20} properties that are generally viewed as support of carcinogenic processes under the influence of HPVs. On the basis of these observations one must conclude that infection with high-risk HPVs plays an etiological role in at least a proportion of malignancies of the oral cavity.

The number of mechanistic studies that support the causal association with malignant lesions of the oral cavity is still small, and

the type of evidence, for example the distinction between episomal and chromosomally recombined HPV genomes, and the stoichiometric relationship between the number of cells in a biopsy and the amount of detectable HPV DNA and RNA has technical limitations and is often difficult to interpret. We started the project reported here with the goal to supplement and strengthen the mechanistic evidence for the role of HPV-16 in oral carcinomas. Our study follows up on our previous investigation of DNA methylation of HPV-16 and 18 genomes during the regular viral life cycle and carcinogenic progression in anogenital sites.

The term DNA methylation refers to the transfer of a methyl group to cytosine residues, which are stably maintained at CpG dinucleotides (mCpGs). mCpGs lead to the binding of transcriptional repressors, part of a network of epigenetic regulatory pathways.^{21–23} mCpGs can be detected by a combination of bisulfite modification, PCR amplification, cloning and DNA sequencing. When we targeted this approach in past studies to HPV-16 and 18 genomes in cervical and anal lesions, we observed a complex diversity of methylation patterns of HPV genomes both in the comparison of different clinical samples and even within individual clinical samples.^{24–28} Among these different patterns, hypermethylation of the HPV-16 and 18 L1 gene and of the HPV-16 long control region (LCR) was common in carcinomas and high-grade lesions, but rare or absent in asymptomatic infections or low-grade lesions, likely a consequence of genomic recombination and aberrant transcription. Here we report that we observed the same mCpG patterns in HPV-16 DNA in oral carcinomas. Our findings show that epigenetic changes of HPV-16 genomes resemble one another in epithelia as divergent as the cervix, the anus, and different sites of the oral cavity, and strongly suggest an epigenetic alteration of these viral genomes typical of carcinogenic processes.

Material and methods

Clinical specimens

This study was based on 62 consecutive patients with newly diagnosed oral cancer and without any previous treatment that attended the Head and Neck Department of the Instituto Nacional de Cancerología-SS, México, D. F. All patients were diagnosed and treated following standard clinical practice. All patients signed written, informed Institutional Review Board approved consent. No patient was sampled for the purpose of the specific research described here.

Grant sponsor: NIH; Grant number: RO1 CA-91964; Grant sponsor: UC-MEXUS-CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología); Grant number: 45987; Grant sponsor: Chao Family Comprehensive Cancer Center of the University of California Irvine.

*Correspondence to: Department of Molecular Biology and Biochemistry, University of California Irvine, Irvine, CA 92697, USA.

Fax: • 1-949-824-8551. E-mail: hbernard@uci.edu

Received 31 October 2006; Accepted after revision 1 December 2006

DOI 10.1002/ijc.22563

Published online 2 February 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

TABLE I - DEMOGRAPHIC AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF 12 PATIENTS WITH HPV-16 ASSOCIATED CARCINOMAS OF THE ORAL CAVITY¹

Sample	Gender	Age	Tobacco consumption	Alcohol consumption	Anatomical site/OSCC localization	Clinical stage	Histological grade
C1	F	52	Yes	No	Gingiva	IV	Moderately differentiated
C2	M	62	Yes	No	Tongue	III	Well differentiated
C3	M	31	No	No	Palate	III	Well differentiated
C4	M	53	No	No	Tongue	III	Well differentiated
C5	F	75	No	No	Gingiva	III	Well differentiated
C6	M	55	Yes	Yes	Tongue	IV	Moderately differentiated
C7	F	59	No	No	Tongue	I	Well differentiated
C8	F	56	No	No	Tongue	IV	Well differentiated
C9	M	71	Yes	Yes	Floor mouth	IV	Moderately differentiated
C10	F	66	Yes	No	Tongue	III	Well differentiated
C11	M	57	No	No	Gingiva	I	Well differentiated
C12	F	31	No	No	Tongue	III	Moderately differentiated

¹The classification of the clinical stage and histological grade followed AJCC recommendations.³²

No patient identifiers were available to all researchers involved in this study. Samples were obtained through punch biopsy (6 mm), and divided into 2 parts: 1 section was fixed for histopathological diagnosis, and the other 1 placed in a Falcon tube containing Preserve-Cyt solution (Cytoc, Marlborough, USA), and stored at -20°C. DNA was extracted from the samples by standard procedures, and HPV-typing was performed with MY09/11 and GP5+/6+ consensus primers as described.²⁹ Fifteen out of 62 patients (24%) were found to contain HPV-16. Twelve of the 15 samples had sufficient DNA for the experiments reported in this study.

Bisulfite modification

For bisulfite treatment,³⁰ 50–1,000 ng of sample DNA supplemented with 1 µg of salmon sperm DNA in a total volume of 18 µl in water were denatured with 2 µl of 3 M NaOH and incubated at 37°C. After denaturation, 278 µl of 4.8 M sodium bisulfite and 2 µl of 100 mM hydroquinone were added with the mixture being incubated in a thermal cycler for 20 cycles of 55°C for 15 min and 95°C for 30 sec. The modified DNA was desalted with the QIAquick PCR purification protocol and desulfonated thereafter by adding 5.5 µl of 3 M NaOH and 5 µg glycogen prior to 15 min incubation at 37°C. The DNA was precipitated with 5.6 µl of 3 M sodium acetate and 150 µl of 100% ethanol, followed by centrifugation. The pellet was washed with 70% ethanol and dissolved in 30–50 µl of TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA).

Polymerase chain reactions, primers, T/A cloning and DNA sequencing

We report here the detailed analysis of a segment of the HPV-16 genome between the genomic positions 7049 and 115, which includes the 3' part of the L1 gene and the LCR. Since bisulfite treated DNA is partially degraded, large amplicons cannot be generated, and we dissected this segment into 3 amplicons. The sequences of the 3 primer pairs were designed according to the genomic sequence of HPV-16³¹ assuming conversion of all cytosine residues into uracils. They are identical to those described in a previous study.²⁶ We amplified part of the L1 gene and the 5'LCR with the primers 16msp3F (position 7049–7078, AAGTAGGATTGAAGGT-TAAATTTAAATTTA) and 16msp3r (position 7590–7560, AAC-AAACAATACAAATCAAAAAACAAAAA); the HPV-16 enhancer with the primers 16msp4F (position 7465–7493, TATGTT-TTTTGGTATAAAATGTGTTTTT) and 16msp7R (position 7732–7703, TAAATTAATTTAAACAAACCAAAAAATATAT); and the HPV-16 promoter with the primers 16msp5F (position 7748–7777, TAAGGTTTAAATTTTAAAGGTTAATTTAAAT) and 16msp8R (position 115–86, ATCTTAAACATTAACAATTCCTTTTAAATA).

PCR was carried out in a 25 µl volume containing 0.2 mM of each of the 4 dNTPs, 10 pmol of each primer, 2 mM MgCl₂ and 1 unit of AmpliTaqGold (Perkin-Elmer). The PCR conditions were 94°C for 1 min, followed by 40 cycles of 94°C for 10 sec, 54°C for 30 sec and 68°C for 1 min with a final extension at 68°C for 7 min. The presence of PCR products was verified by agarose gel electrophoresis, and con-

firmed amplicons were cloned with the TOPO TA cloning kit for sequencing (Invitrogen). Cloned DNAs were sequenced by Big Dye terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems).

Results

HPV-16 genomes in 15 out of 62 oral carcinomas from Mexican patients

Our research was based on DNA extracted from carcinomas of the oral cavity of 62 consecutive patients that required medical treatment at the Instituto Nacional de Cancerología-SS, México. Our experiments were unrelated to the medical services rendered to the patients and were performed with biopsies discarded after completion of all diagnoses and treatments. Twenty-six of the 62 samples contained any HPV type as measured by PCR amplification with MY09/11 and GP5+/6+ primers and direct DNA sequencing. A detailed pathological study of these 62 samples will be published elsewhere (Anaya-Saavedra and Garcia-Carranca, unpubl. observations). Among the 26 samples with HPV DNA, 15 contained HPV-16. Twelve of these 15 DNA preparations contained sufficient DNA for the analysis of DNA methylation. The demographic and clinical characteristics of these 12 patients are reported in Table I. Specifically, it should be noted that samples from 4 different sites were included in this study, 7 from the tongue, 3 from the gingiva, and 1 each from the palate and the floor of the mouth. There was no obvious linkage of the HPV-16 DNA methylation patterns discussed in the following paragraphs with anatomical site, gender, pathological state, smoking or alcohol consumption.

Design of the HPV-16 DNA methylation analysis

In published studies we had learned that DNA preparations from each individual cervical or anal HPV infection frequently contain mixtures of HPV-16 and 18 genomes with different methylation patterns, i.e. in the same position of different HPV genomes either CpGs or mCpGs.^{26–28} To approach a satisfactory analysis of such mixtures of molecules, we have developed a standardized protocol that we applied here to DNA preparations from oral carcinomas. We treat DNA samples with bisulfite, which converts cytosines into uracils but does not affect methyl cytosine. A subsequent PCR amplification converts methyl cytosines into cytosines and uracils into thymines.³⁰ The amplicons are cloned into E. coli plasmids and individual plasmid clones are sequenced. Cytosine residues indicate nucleotides that had been methyl cytosines *in vivo*. In this standardized protocol we analyze a 913 bp genomic segment between the positions 7079 and 85, which contains part of the L1 gene and the LCR.³³ The segment has altogether 19 CpGs, 3 derived from the 3' end of the L1 gene (7091, 7136 and 7145), 5 from the 5'-segment of the LCR (7270 to 7461), 5 from the transcriptional enhancer (7535 to 7695), one from the replication origin (7862) and 5 from the E6 promoter (31–58). Unfortunately, bisulfite modification introduces nicks in

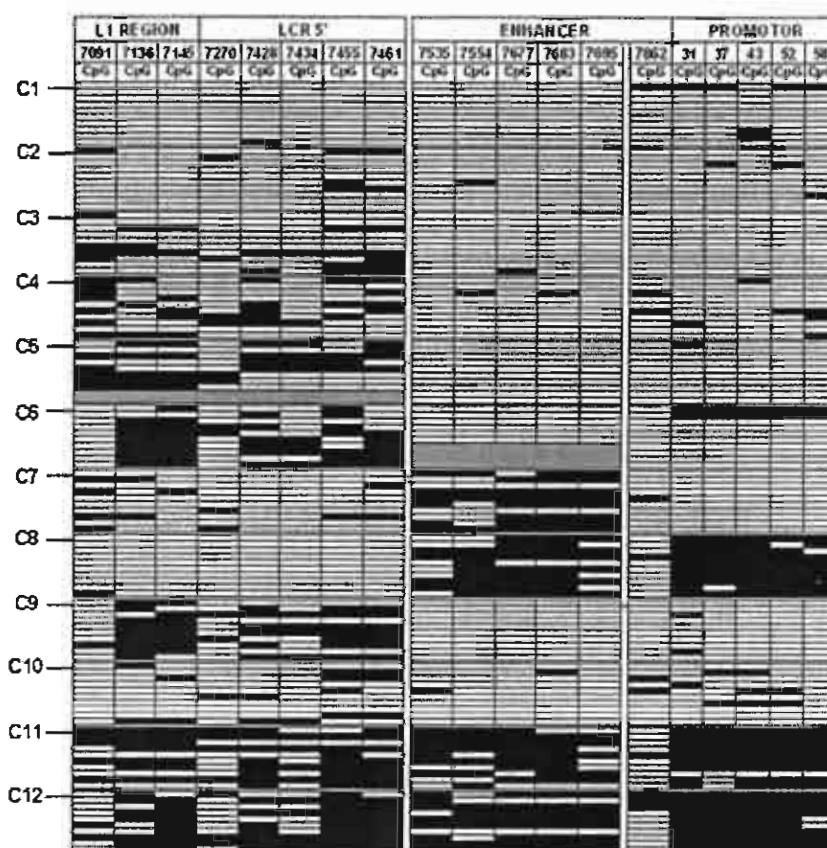


FIGURE 1—CpG methylation of HPV-16 genomes derived from carcinomas of the oral cavity. The figure visualizes the methylation of 19 CpG dinucleotides in the HPV-16 genomes of 10 independent clones each derived from 1 of 12 clinical samples, a database of the methylation status of 2,244 CpG dinucleotides. C1–C12: Designation of carcinomas from the patients listed in Table I. White horizontal rectangles represent unmethylated CpGs, black rectangles meCpGs. Each group of 10 horizontal lines represents clones derived from 1 patient. A horizontal group of rectangles does not indicate a contiguous 913 bp amplicon, but is derived from 3 different HPV-16 genomes, as indicated by 2 white vertical bars. These discontinuities were a technical necessity, since the destruction of bisulfite modified DNA did not allow us to generate the analyzed 913 bp fragment in 1 contiguous amplicon. Two grey areas indicate a lack of information, as we could not generate those missing 6 plasmid clones due to a shortage of the respective sample DNA.

DNA. As a consequence, it is impossible to PCR amplify efficiently genomic segments with sizes exceeding a few hundred base pairs. Because of this limitation, we dissect the 913 bp segment into 3 amplicons with ends at the genome positions 7091 to 7461, 7535 to 7695 and 7862 to 58. As a consequence, while we aim to gather methylation information from 10 HPV-16 DNA molecules from each sample, data for each of these 3 segments represent the methylation status of different, non-contiguous molecules. Figure 1 shows each amplicon as a line of horizontal segments, the three amplicons separated by two white vertical bars. The numbers C1 to C12 identify the 12 carcinomas, and each of the 10 lines of rectangles a cloned PCR amplicon. White rectangles indicate CpGs, black rectangles meCpGs. Altogether, our investigation led to a database of the methylation state of 2244 CpG dinucleotides in 354 amplicons. In contrast to our past studies of HPV infections in anogenital sites, we present here only an analysis of malignant lesions, and not of asymptomatic infections and precursor lesions. The clinical investigations that led to our research identified 10 HPV-16 positive samples from asymptomatic sites with viral DNA concentrations at the threshold of detectability by PCR. Bisulfite treatment reduced 9 of the 10 HPV-16 DNA preparations to levels that did not generate a measurable PCR signal. It is interesting; however, in consideration of the methylation patterns in carcinomas reported below, that we could generate from 1 asymptomatic sample with sufficient DNA fifteen amplicons, which had all 19 CpG residues completely unmethylated (data not included in Fig. 1).

Methylation of the L1 gene and the 5' LCR of HPV-16

The amplicon representing the 5' part of the target segment includes 8 CpGs, 3 within the L1 gene (position 7091, 7136 and 7145), and 5 in the 5' part of the LCR. All of these 8 CpGs had been found hypomethylated in asymptomatic infections and precancerous lesions of the cervix, but hypermethylated (2- to 4-fold

increased) in cervical carcinomas, probably since L1 is not transcribed in carcinomas.²⁶ In the 12 oral lesions examined here, we observed methylation frequencies of the 3 L1 CpGs of 25, 38 and 39%, approaching the high levels found in cervical lesions (43–54%). While two samples contained many unmethylated molecules (C1 and C8), there was substantial methylation of most molecules in all other 10 samples. The average methylation of all CpGs in this segment was maximal in the samples C6, C8, C11 and C12 (50, 55, 58 and 65%, respectively), exceeding the methylation levels found in most cervical carcinomas.

Methylation of the enhancer and promoter of HPV-16

The enhancer and promoter of at least 1 HPV-16 genome in precancerous lesions and carcinomas have to remain unmethylated to actively transcribe the *E6* and *E7* oncogenes. This is exemplified in the cell line SiHa, which contains only 1 HPV-16 genome. However, most carcinomas contain many, sometimes hundreds of HPV-16 genomes, exemplified by the cell line CaSki. Most of these genomes are methylated, possibly resulting from tandem arrangements and chromosomal recombination. As a consequence, they are transcriptionally silent, while continued oncogene expression occurs from a single HPV-16 genome.^{25,34} As a consequence of this constellation, and at first glance against intuition, HPV-16 enhancer and promoter methylation is in many clinical samples an indicator of carcinogenic processes in the infected cell.

The central amplicon targeted in this study contains 5 CpGs between the genomic positions 7535 and 7695, overlapping with the transcriptional enhancer. In the examined oral carcinomas, this amplicon was found hypermethylated in C7, C8, C11 and C12, and nearly unmethylated in the remaining 8 samples.

The 3' amplicon includes 6 CpGs between the genomic positions 7862 and 58. The CpG at position 7862 is part of the *E2* binding site at the viral replication origin, the other 5 CpGs between the genomic positions 31 and 58 of the HPV-16 genome

are part of the Sp1 and E2 binding sites of the E6 promoter. Figure 1 shows that promoter sequences are nearly completely methylated in 3 of the 12 cancers (C8, C11 and C12), a pattern that we had only observed in anogenital high-grade lesions and carcinomas. Interestingly, position 7862, which is part of the replication origin, was nearly always unmethylated, a phenomenon that we noted in all previous studies, but which is yet unexplained.^{26,28}

Overall, we measured a methylation rate of 28.2% for the 5 CpGs in the promoter segment in oral lesions, exceeding the rate found in cervical cancer and identical to that in high-grade anal lesions (18 and 28.2%, respectively), while methylation rates in asymptomatic infections and low-grade anogenital lesions had been 1 to 2 orders of magnitude lower.^{26,28}

Discussion

The investigation of DNA methylation of cellular and viral genes is of great importance, as this modification affects the conformation of nucleosomes in a complex network of epigenetic changes that include histone methylation, histone acetylation and histone deacetylation.²¹⁻²³ The resulting chromatin changes constitute a major molecular pathway that regulates cellular gene expression during embryogenesis and differentiation. In the biology of most viruses DNA methylation does not appear to play a role, but previous studies from our group²⁴⁻²⁸ and others³⁴⁻³⁶ have shown that HPV-16 and 18 are among those few viruses that are strongly affected by this mechanism.

Some preliminary studies suggest that DNA methylation plays a role in the normal lifecycle of HPV-16, possibly by silencing transcription in undifferentiated cells and/or by inducing latency.^{26,36} This phenomenon, which mostly affects the viral enhancer and occurs at very low levels of HPV DNA concentration, is unfortunately not yet well understood because of the difficulties to study these viruses in cell culture. The research presented here does not attempt to address DNA methylation during the normal viral biology.

In contrast, there is now detailed information about the methylation of HPV DNA during carcinogenesis based on the study of HPV genomes in clinical samples. As HPV-16 and 18 genomes often recombine with cellular DNA during tumor progression, they are linearized and their normal gene sequences become interrupted, which terminates transcription of genes that are now positioned 5' of the LCR. This leads apparently to methylation of these DNA sequences, since lack of transcription is known to trigger *de novo* DNA methylation of any DNA.²² Similarly, extensive evidence suggests that the recombination of any DNA with chromosomes triggers methylation, probably since these sequences frequently target heterochromatin, transcriptionally silent parts of the genomes.³⁷ As a consequence, a combination of high HPV DNA concentrations in a clinical sample combined with hypermethylation of L1, the enhancer and promoter has become a useful test to detect recombination, and thereby char-

acterize established malignancies and identify mixed cell populations with subpopulations that progress toward malignancy.^{26-28,35,36}

Here we documented that HPV-16 genomes in 10 out of 12 carcinomas of the oral cavity were altered by DNA methylation in a manner typical of carcinomas and high-grade lesions of the cervix and the anus, suggesting that HPV-16 genomes are chromosomally integrated in oral malignancies and affect the host cells in a similar manner as in anogenital malignancies. It should also be noted that certain patterns, e.g. the nearly complete lack of methylation at position 7862 in all samples, and the selective hypermethylation of promoter sequences in some samples, have become a recurrent theme of HPV-16 methylation patterns in any anatomic site, and are clearly properties of the viral DNA irrespective of the anatomical site of the affected host cell. It has been pointed out by others³⁵ that promoter methylation may favor carcinogenesis, as it prohibits binding of the E2 protein,³⁸ which is a repressor of the E6 promoter, and assures continued oncogene expression even in the subpopulation of lesions that did not lose E2 as a consequence of genomic interruption.³⁹

The data of this study and our previous studies provide strong support that the measurement of DNA methylation is a useful biomarker to characterize malignant lesions. Ten of the 12 oral lesions that we examined showed hypermethylation typical for malignancies. The characteristics of SiHa cells and some anogenital lesions that we examined previously²⁶ show that these methylation patterns can be sufficient but are not necessary for the malignant state, as cancers that contain a single viral genome must keep this in unmethylated form for continued oncogene transcription. Therefore, HPV-16 may have been the etiological cause of all 12 oral carcinomas of this study. The experimental strategy that we selected here documented refined details of the heterogeneous patterns HPV-16 DNA populations encountered in oral carcinomas. To develop HPV DNA methylation as a sensitive and robust diagnosis we recently examined methylation specific primers and methylation specific fluorescence probes in real time amplifications, targeting HPV-18 DNA.⁴⁰ While these two approaches do not reveal all subtleties of methylation patterns, they cut the laboratory work required for qualitative and quantitative analysis of larger sets of clinical samples by 1 to 2 order of magnitude, and will allow high-throughput analyses required for larger medical studies once similar technology is established for HPV-16.

Acknowledgements

Our research was supported by NIH grant ROI CA-91964 to H.U.B., by a UC-MEXUS-CONACYT to A.G.C. to fund sabbatical research in the H.U.B. lab, by the grant CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) number 45987 to V.R.A., and by funds from the Chao Family Comprehensive Cancer Center of the University of California Irvine to H.U.B.

References

1. International Agency for Research on Cancer Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human papillomaviruses, vol. 64. Lyon: IARC, 1995.
2. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 2001;20:7874-87.
3. Munger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, Zaczyn VL. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 2001;20:7888-98.
4. Munoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM. Epidemiological classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27.
5. Schiffman MH, Brinton LA. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer* 1995;76:1888-901.
6. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342-50.
7. Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, Lissowsky J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernandez L, Idris A et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:1772-83.
8. Mork J, Lie AK, Glatre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, Moller B, Pukkala E, Schiller JT, Youngman L, Lehtinen M, Dillner J. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2001;344:1125-31.
9. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:675-7.
10. Badaracco G, Venuti A, Morello R, Muller A, Marcante ML. Human papillomavirus in head and neck carcinomas: prevalence, physical status and relationships with clinical/pathological parameters. *Anticancer Res* 2000;20:1301-5.
11. Ferris RL, Martinez I, Sirianni N, Wang J, Lopez-Albaitero A, Gollin SM, Johnson JT, Khan S. Human papillomavirus-16 associated squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN): a natural disease

- model provides insights into viral carcinogenesis. *Eur J Cancer* 2005;41:807-15.
12. van Houten VM, Snijders PJ, van den Brekel MW, Kummer JA, Meijer CJ, van Leeuwen B, Denkers F, Smeete LE, Snow GB, Brakenhoff RH. Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001;93:232-5.
 13. Braakhuis BJ, Snijders PJ, Keune WJ, Meijer CJ, Ruijter-Schippers HJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:998-1006.
 14. Hobbs CG, Sterne JA, Bailey M, 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.
 15. Wilczynski SP, Lin BT, Xie Y, Paz IB. Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 1998;152:145-56.
 16. Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 2005;32:S59-S66.
 17. Snijders PJ, Cromme FV, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow GB, Meijer CJ, Walboomers JM. Prevalence and expression of human papillomavirus in tonsillar carcinomas, indicating a possible viral etiology. *Int J Cancer* 1992;51:845-50.
 18. Dahlgren L, Dahlstrand HM, Lindquist D, Hogmo A, Bjornestal L, Lindholm J, Lundberg B, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus is more common in base of tongue than in mobile tongue cancer and is a favorable prognostic factor in base of tongue cancer patients. *Int J Cancer* 2004;112:1015-19.
 19. Mellin H, Dahlgren L, Munck-Wikland E, Lindholm J, Rabbani H, Kalantari M, Dalianis T. Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int J Cancer* 2002;102:152-8.
 20. Ragin CC, Reshmi SC, Gollin SM. Mapping and analysis of HPV16 integration sites in a head and neck cancer cell line. *Int J Cancer* 2004;110:701-9.
 21. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16:6-21.
 22. Fuks F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:490-5.
 23. Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2005;74:481-514.
 24. Badal S, Badal V, Calleja-Macias IE, Kalantari M, Chuang LSH, Li BFL, Bernard HU. The human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular DNA methylation. *Virology* 2004;324:483-92.
 25. Badal V, Chuang LSH, Badal S, Tang E, Villa LL, Wheeler CM, Li BFL, Bernard HU. CpG methylation of human papillomavirus-16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *J Virol* 2003;77:6227-34.
 26. Kalantari M, Calleja-Macias IE, Tewari D, Hagmar B, Barrera-Saldana HA, Wiley DJ, Bernard HU. Conserved methylation patterns of human papillomavirus-16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. *J Virol* 2004;78:12762-72.
 27. Turan T, Kalantari M, Calleja-Macias IE, Villa LL, Cubie HA, Cuschieri K, Skomedal H, Barrera-Saldana HA, Bernard HU. Methylation of the human papillomavirus-18 L1 gene: a biomarker of neoplastic progression? *Virology* 2006;349:175-83.
 28. Wiley DJ, Huh J, Chang C, Kalantari M, Rao JY, Goetz M, Msong-song E, Poulter M, Bernard HU. Methylation of human papillomavirus DNA in samples of HIV-1 infected men screened for anal cancer. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;39:143-51.
 29. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Bauer HM, Peyton C, Wheeler CM. Assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction, restriction digest, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 1994;170:1077-85.
 30. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Wan F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:1827-31.
 31. Myers G, Bernard HU, Delius H, Favre M, Iconogole J, van Ranst M, Wheeler C, eds. Human papillomaviruses 1994 Compendium. Los Alamos, New Mexico, USA: Los Alamos National Laboratory, pp. 1-C-4 to 1-A-7, 1994.
 32. Bernard HU. Gene expression of genital human papillomaviruses and potential antiviral approaches. *Antivir Ther* 2002;7:219-37.
 33. Van Tine BA, Kappes JC, Banerjee NS, Knops J, Lai L, Steenbergen RD, Meijer CJ, Snijders PJ, Chatis P, Broker TR, Moen PT, Jr, Chow LT. Clonal selection for transcriptionally active viral oncogenes during progression to cancer. *J Virol* 2004;78:11172-86.
 34. Bhattacharjee B, Sengupta S. CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology* 2006;354:280-5.
 35. Kim K, Garner-Hamrick PA, Fisher C, Lee D, Lambert PF. Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *J Virol* 2003;77:12450-9.
 36. Doerfler W, Remus R, Muller K, Heller H, Hohlweg U, Schubert R. The fate of foreign DNA in mammalian cells and organisms. *Dev Biol* 2001;106:89-97.
 37. Thain A, Jenkins O, Clarke AR, Gaston K. CpG methylation directly inhibits binding of the human papillomavirus type 16 E2 protein to specific DNA sequences. *J Virol* 1996;70:7233-5.
 38. Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* 2006;44:1755-62.
 39. Turan T, Kalantari M, Cuschieri K, Cubie HA, Skomedal H, Bernard HU. High-throughput detection of human papillomavirus-18 L1 gene methylation, a candidate biomarker for the progression of cervical neoplasia. *Virology*, epub (2006).
 40. American Joint Committee on Cancer. AJCC Cancer staging manual, 5th Edition. Chicago: Lippincott Williams and Wilkins, 1997.

El rol de los papilomavirus humanos en la carcinogénesis bucal

Dra. Irma Gabriela Anaya Saavedra

Especialista en Patología y Medicina Bucal
Alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma Metropolitana
México, D.F.

Contenido

Introducción

Biología molecular de los papilomavirus humanos

Resumen

Organización general del genoma

Oncogenes E6 y E7

Patogenicidad al hospedador humano

Resumen de la enfermedad

Asociación del VPH con el cáncer bucal

Resumen

Introducción

Definición y prevalencia

Investigación

Transmisión sexual

Consecuencias genéticas

Conclusiones

Perspectivas

Referencias

● Introducción

Los papilomavirus humanos (VPH), pertenecientes a la familia Papillomaviridae, son responsables del desarrollo de lesiones epiteliales benignas y malignas en la piel y mucosas. A pesar de que se ha aislado y secuenciado el genoma completo de poco más de 100 tipos de VPH, los datos recientes indican que existen más de 200 tipos diferentes.¹ Algunos de ellos participan de manera importante en el desarrollo del cáncer cervical, y de acuerdo con evidencias recientes, también en los carcinomas de la cavidad bucal.

● Biología molecular de los papilomavirus humanos

Nomenclatura

La clasificación de los papilomavirus se basa en homologías en la secuencia de sus nucleótidos debido a que las proteínas que conforman la cápside de todos los tipos son antigénicamente similares. Los tipos de VPH muestran entre sí una diversidad en la secuencia de nucleótidos del gen L1 de por lo menos el 10%. El término "subtipo" se utiliza para definir aquellos papilomavirus que tienen en el gen L1 secuencias diferentes a los demás tipos en 2 a 10% de los nucleótidos. Finalmente, las variantes de VPH difieren en hasta 2% del genoma prototipo.¹

Adicionalmente, los VPH han sido subdivididos en grupos con base en la lesión que son capaces de producir después de la infección² (cuadro 6.1). Los virus de bajo riesgo se han asociado con lesiones proliferativas benignas, en tanto que los virus de alto riesgo presentan un riesgo incrementado de desarrollar neoplasias malignas.³

Cuadro 6.1 Clasificación epidemiológica de los papilomavirus²

Clasificación del riesgo	Tipos de VPH
Alto riesgo	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
Probable alto riesgo	26, 53, 66
Bajo riesgo	6, 11, 13, 32, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108
Riesgo indeterminado	34, 57, 83

Organización general del genoma

Los papilomavirus, simétricos e icosaédricos, no poseen envoltura, aunque sí una cápside viral compuesta por una proteína mayor y una menor. Setenta y dos capsómeros rodean el DNA circular y de doble hélice formado por alrededor de 8 000 pares de bases (pb).⁴

Tomando como referencia al VPH-16, se distinguen tres regiones principales (temprana, tardía y región larga de control). En la región temprana (E) se encuentran todos los genes reguladores de la transcripción, replicación y ciclo viral; en la región tardía (L) están los genes que codifican las proteínas mayor (L1) y menor (L2) de la cápside viral. La región larga de control (LCR) o región no codificante, de aproximadamente 1 000 pb, contiene los elementos cis-regulatorios de la transcripción viral, como el promotor (p97) y el origen de replicación (ori).⁵

Como se observa en la figura 6.1, la información genética se encuentra codificada en una sola de las cadenas de DNA, debido a que los genes tienen una sola orientación transcripcional, con sobreposición de algunos de ellos.⁴

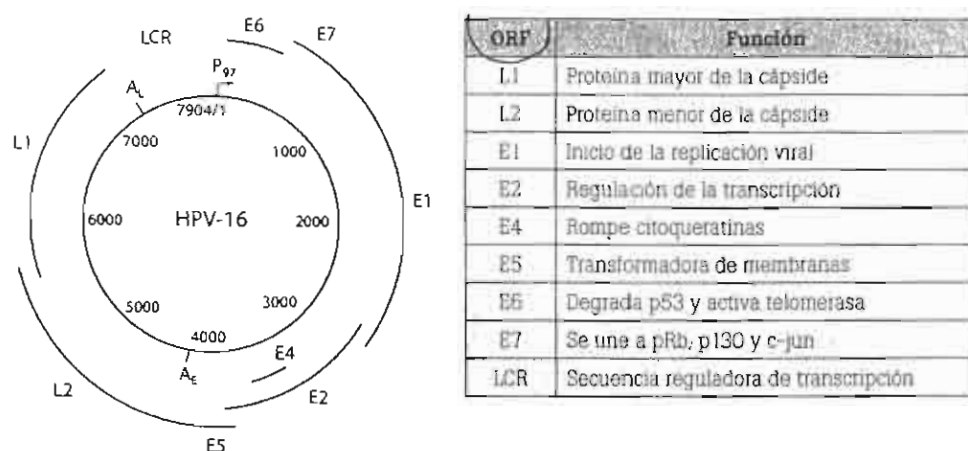


Figura 6.1 Organización genómica del VPH-16 y sus principales funciones proteicas.

Oncogenes E6 y E7

Los productos de estos genes inducen el mantenimiento del estado inmortalizado de las células que contienen secuencias de VPH. Los genes se expresan selectivamente en los tumores y líneas celulares derivadas de tumores humanos y se conservan intactos durante la integración del DNA viral al genoma celular.⁴

En los VPH-16 y 18, la proteína E6 interactúa con el regulador antioncogénico p53, conduciendo a la degradación de la proteína p53, con lo que se pierde la capacidad de reparar daños en el DNA o de iniciar la apoptosis cuando el daño es irreparable. La proteína E6 de los VPH de bajo riesgo 6 y 11 no induce degradación de p53, lo que le confiere su débil potencial de transformación.^{4,5}

El producto del gen E7 presenta funciones regulatorias transcripcionales, y en conjunto con E6 es capaz de transformar e inmortalizar células *in vitro*.⁵ Además, E7 controla el ciclo celular interactuando con el regulador antioncogénico P105 Rb y otras proteínas asociadas a Rb, lo que da como resultado la activación del ciclo celular en la célula infectada de forma desregulada.⁶

La proteína E7, al asociarse con la proteína pRb, libera el factor transcripcional E2F-1, que se halla unido a pRb. E2F1 activa la transcripción de diferentes genes celulares que promueven la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la S. Todo esto lleva consigo la pérdida del control del ciclo celular y es responsable de la inestabilidad genómica que precede a la transformación celular.^{4,7}

La expresión de oncogenes virales E6 y E7 representa un indicador de la relación causal entre VPH y el cáncer bucal, en analogía con lo que sucede con el cáncer cervical,⁷ sin embargo, igualmente importante es la inactivación funcional de pRb para el control del ciclo celular. Recientemente se ha propuesto que la detección de

VPH en el cáncer de cabeza y cuello debe acompañarse del análisis de la expresión del gen E6.⁷

Especificidad tisular y ciclo viral

La infección por VPH se limita a epitelios escamosos (piel y mucosas) y se presenta sólo en las células basales del epitelio en división. La infección por papilomavirus ocurre por contacto directo. Comienza en las células basales, las cuales son mitóticamente activas, y después el virus permanece en el estrato basal, se integra al genoma o se replica para producir partículas virales.⁸

El DNA del virus se replica, transcribe y es capaz de formar viriones completos a medida que las células epiteliales se diferencian.⁸ Las células basales son poco activas en la expresión de proteínas virales ya que existen factores celulares que regulan la transcripción viral. Al migrar a las capas superficiales, estas células se diferencian y ya no pueden dividirse, y es entonces cuando, tras la transcripción de los genes tempranos y tardíos del VPH, inicia la producción de partículas virales.^{8,9}

En células completamente diferenciadas el virus se replica con un alto número de copias y expresa entonces sus genes tardíos L1 y L2. Debido a que se trata de virus no líticos, se vierten al medio extracelular dentro del epitelio escamoso.⁸

El genoma del VPH se replica como un episoma extracromosómico (plásmido) en las lesiones benignas; sin embargo, el DNA viral se ha encontrado integrado con mucha frecuencia dentro del cromosoma hospedero en las lesiones malignas cervicales, generalmente amplificados en unas 5-200 copias por célula.⁴

La integración al genoma del hospedero se da en la región E1-E2 del virus, provocando su rompimiento, por lo que ya no se sintetiza una proteína E2 funcional. Al ser la proteína E2 un factor que regula negativamente la expresión de los genes E6 y E7 (se une a su promotor), se tiene como consecuencia un aumento en la transcripción de dichos genes.^{10,11}

En un estudio realizado en muestras de cáncer bucal (CB) positivas a VPH-16, se encontró que 48% tiene el virus integrado al cromosoma hospedero, 35% se halla en forma episomal, y 17% en ambas formas.¹² Snijders *et al.*¹³ se percataron que los carcinomas de amígdala positivos a VPH-16 se encuentran en forma episomal, en contraste con los carcinomas positivos a VPH-33 que están en forma integrada y en formas combinadas (episomal-integrada). Los individuos con VPH integrado tienen en promedio diez años más que aquellos con formas episomales, lo que sugiere que la integración es un evento temprano en la carcinogénesis inducida por los papilomavirus.¹⁴

Diagnóstico molecular

Para la óptima detección del VPH, es sumamente importante el tipo de muestreo, ya que el mayor índice de detección se logra a través de especímenes de biopsia, particularmente si se trabaja con tejido fresco; el análisis en bloque de parafina baja la sensibilidad de detección, de 51.6 a 21.7% (tejido fresco vs. desparafinado).⁵ Debido a su carácter inocuo e indoloro, en los últimos años se ha adoptado con mucha frecuencia el uso de cepillados o enjuagues de la mucosa bucal. La desventaja del uso de estas técnicas es que puede haber una subestimación del resultado verdadero, ya que la mayor cantidad de copias virales se encuentran en

estratos profundos del epitelio que pueden no estar presentes en el muestreo realizado.¹⁶

El método que se utilice para purificar DNA reviste gran importancia en la detección del DNA genómico del VPH y también puede afectar el índice de detección del virus, lo cual ha contribuido sustancialmente a las inconsistencias reportadas en la literatura. En un estudio reciente fueron comparados cinco métodos diferentes para la purificación de DNA a partir de enjuagues bucales: digestión con proteinasa K (PKD) e inactivación por calor, PKD y precipitación con etanol, PKD y extracción con fenol-cloroformo, QIAamp DNA Blood Midi kit, y Puregene DNA purification kit; este último es el que mayor detección de DNA-VPH ofrece a través de amplificación del DNA con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).¹⁷

En la actualidad los métodos usados para el diagnóstico de la infección por VPH se basan principalmente en la detección del DNA viral y han sido agrupados en ensayos de alta sensibilidad (PCR, 37.1%), y ensayos de moderada (Southern blot, 25.2%) y baja sensibilidad (hibridación *in situ* o inmunohistoquímica, 16.9%).¹⁵

La técnica de PCR ha sido la técnica más utilizada para la detección de DNA-VPH, entre otras cosas, por su accesibilidad y bajo costo.¹⁸ En muestras de mucosa bucal la técnica de PCR anidada con oligonucleótidos GP5+/6+ es actualmente el método más sensible y reproducible con la que contamos.¹⁹

● Asociación del VPH con el cáncer bucal

Desde que en 1983, Syrjänen *et al.*²⁰ reportaron la relación entre VPH y cáncer bucal, numerosos estudios epidemiológicos han identificado al virus en muestras de mucosa normal, lesiones premalignas y malignas. Existe evidencia biológica de que el gen E6 del VPH y las oncoproteínas del gen E7 producen immortalización y transformación de los queratinocitos de la mucosa bucal, lo que sugiere que la presencia del virus constituye un factor importante en la etiología del cáncer bucal.^{21,22}

En cáncer bucal y orofaríngeo, se han reportado frecuencias de papilomavirus que varían del 0 al 100%;²³ esta diversidad se debe a las diferencias metodológicas de los estudios, entre las que destacan el número de casos incorporados, la población sujeta a estudio, el método y sitio de colección de la muestra, la extracción de DNA, y el método molecular utilizado para la detección del DNA viral.

A pesar de esta variabilidad, la asociación de VPH-16 con el desarrollo de tumores malignos de cabeza y cuello ha sido bien demostrada.^{23,24} En un estudio de casos y controles anidado se encontró que los pacientes seropositivos a VPH-16 tienen un riesgo 14.4 veces mayor de desarrollar cáncer orofaríngeo.²⁵

Los papilomavirus 16 y 18 son los tipos que se han asociado con mayor frecuencia con el desarrollo de cáncer bucal; se ha sugerido que su papel oncogénico se fundamenta en la disrupción de genes protectores o la activación de oncogenes por medio de la integración del cromosoma viral,²⁶ o por la expresión de los genes E6 y E7 que pueden inactivar e inducir la degradación de los productos de los genes supresores de tumores p53 y pRb.⁴ Si bien se han encontrado estos tipos de alto riesgo en mucosa normal, en virtud de que los queratinocitos son capaces de albergar a los papilomavirus en forma latente,²⁶ la probabilidad de detectar VPH en CB es aproximadamente 4.7 veces más alta que la de encontrarlo en mucosa bucal normal.²⁷

Género

A pesar de que en la mucosa genital el virus del papiloma humano afecta preponderantemente al género femenino, y de que la infección en hombres no produce síntomas ni lesiones visibles,²⁸ en la mayoría de los estudios que involucran la mucosa del tracto aerodigestivo superior no se reportan diferencias en los patrones de distribución del virus respecto al género, en mucosa normal o lesiones premalignas,¹⁶ ni en procesos malignos.²⁹⁻³² Sin embargo, Ritchie *et al.*³³ en un estudio realizado en 139 muestras de cáncer bucal y orofaríngeo, encontraron que los hombres tienen casi tres veces más riesgo de tener infección por VPH en la mucosa bucal que las mujeres (OR = 2.9, 95% IC = 1.0 a 8.6).

Edad

Los resultados sobre la prevalencia de papilomavirus en neoplasias malignas de cabeza y cuello y la edad son contradictorios. Se ha descrito que los individuos jóvenes con cáncer bucal tienen mayor riesgo de presentar infección por VPH;³⁴⁻³⁷ otros estudios sugieren que a mayor edad, mayor probabilidad de tener VPH.^{29,38} Sin embargo, en diversos trabajos^{30,32,39} se ha demostrado que la frecuencia de VPH en individuos jóvenes no es diferente respecto a pacientes mayores, sugiriendo que el rol oncogénico del VPH es similar en todos los grupos de edad.

Tabaco y alcohol

Con base en hallazgos moleculares y epidemiológicos, se sabe que las neoplasias malignas asociadas a VPH sin exposición a tabaco o alcohol, tienen un comportamiento biológico diferente que aquellas causadas por estos agentes carcinogénicos,⁴⁰ y que además, las células infectadas por papilomavirus tienden a ser más susceptibles a la acción de estos carcinógenos.⁴¹

Aunque en estudios previos^{42,43} se informó que los individuos no fumadores eran más susceptibles de tener infección por VPH y que las infecciones virales podían actuar de manera sinérgica con la exposición a tabaco y alcohol, en los últimos años se ha reportado que la mayor proporción de neoplasias malignas positivas a VPH corresponde a pacientes no fumadores y no bebedores.^{24,26,30,32,33,36-38,44} Kock *et al.*⁴⁵ sugieren que los mecanismos de carcinogénesis del VPH entre fumadores y no fumadores son diferentes, debido al efecto protector que confiere el tabaco. La producción aumentada de queratina en las superficies normalmente paraqueratinizadas hace a la mucosa más resistente a trauma, uno de los mecanismos necesarios para la infección por VPH en células basales.

Localización

Se ha observado una mayor prevalencia de la infección en tumores orofaríngeos que en aquellos que se presentan en la mucosa bucal,^{32,33,37,46} principalmente en amígdala,^{36,44} y en la base de lengua.⁴⁶

Los papilomavirus, particularmente el VPH-16, se encuentran con mayor frecuencia en neoplasias originadas en sitios con actividad inflamatoria, como el cérvix, las amígdalas y la base de lengua. Al parecer, las células infectadas con VPH, al encontrarse en cercanía a células inmunológicamente competentes capaces

de responder a antígenos induciendo la producción de factores de crecimiento, pueden también estimular la división celular de las células infectadas y facilitar el desarrollo tumoral.⁴⁶

Transmisión sexual

La forma en la que el VPH es transmitido a la mucosa bucal aún no está clara; el DNA-VPH se ha identificado en cepillados de individuos sanos en frecuencias que varían del 1 al 60%,⁴⁷ sin embargo, en el fluido salival no se han encontrado cargas virales elevadas, lo que hace poco probable su transmisión por contacto directo.⁴⁷ El virus ha sido encontrado en recién nacidos de madres infectadas debido a transmisión vertical,⁴⁸ y en niños y adolescentes sin actividad sexual.⁴⁹

Se han practicado numerosos estudios con el fin de identificar al VPH en la mucosa bucal como un patógeno adquirido por vía sexual. Principalmente en estudios de casos y controles, se han encontrado asociaciones significativas entre la presencia de VPH en CB y el número de parejas sexuales y la historia de prácticas orogenitales y oroanales.^{30,33,50} Además de lo anterior, en dos estudios diferentes, se encontraron los tumores positivos a VPH de alto riesgo en hombres cuyas mujeres tuvieron lesión cervical asociada a VPH.^{37,51}

Asociaciones genéticas

A diferencia de estudios en los que no se ha encontrado aumento en la mutación del gen supresor de tumores p53,^{24,32} en otros se ha demostrado que los tumores positivos a VPH muestran polimorfismos y mutación en TP53,^{33,54} desregulación de pRb y sobreexpresión de p16INK4A.³⁶

En general, los tumores positivos a VPH-16 se han descrito como dos tipos genéticamente diferentes: aquellos que exhiben represión del gen E6 y bajo índice de mutaciones en el gen p53, y los que, alternativamente presentan expresión de E6 y mutaciones en p53.^{54,55} Se ha observado que la radioterapia y los agentes citotóxicos son capaces de disminuir la posibilidad de que E6/E7 interfiera con p53 y pRb en los tumores con alta expresión de E6/E7, por lo que este tipo de neoplasias son más vulnerables a la terapia.¹¹

De manera adicional, se ha demostrado que los niveles de proteína pRb están regulados negativamente en el cáncer de cabeza y cuello asociado a VPH-16, lo que permite inferir actividad de E7.⁵⁵ Por otro lado, se ha sugerido que existe una fuerte asociación entre la infección por VPH y la activación del gen H-ras en el carcinoma verrucoso de la mucosa bucal.⁵⁶

Pronóstico

Ritchie *et al.*,³³ reportan que el estado de infección por VPH es un factor independiente del pronóstico en cáncer bucal y orofaríngeo, y que la supervivencia de los pacientes no está asociada con la radioterapia en los tumores positivos a VPH; sin embargo, al analizarlo por género, encuentran que los hombres positivos a papilomavirus tienen un mejor pronóstico que las mujeres.

No obstante, en numerosos estudios se ha relacionado la presencia de papilomavirus en el cáncer bucal y orofaríngeo con un mayor tiempo de supervivencia.

da, 11,24,31,36,38,44,46,57 y se ha observado una mejor respuesta a radioterapia en tumores VPH positivos.⁵⁸ Asimismo, en un estudio longitudinal que incluyó 22 individuos con carcinoma epidermoide de amígdala, se observó que los pacientes con tumores de > 190 copias de VPH tuvieron un mejor resultado clínico, permaneciendo libres de tumor tres años después del diagnóstico; al parecer, estos pacientes tienen un mejor pronóstico debido a que la carga viral alta puede inducir una mejor respuesta inmune contra el cáncer.¹¹

A pesar de que Higa *et al.*⁵⁸ reportan que los tumores positivos a VPH son con mayor frecuencia bien diferenciados, en diversos estudios^{37,50,59} las neoplasias positivas a VPH se han correlacionado con neoplasias mal diferenciadas, no queratinizantes y con morfología basaloide (OR = 18.7, 95% IC = 2.1 a 167).³⁴ Debido a las controversias asociaciones halladas con respecto a la agresividad, pronóstico, y sobrevida de las neoplasias positivas a VPH, consideramos necesario analizar estas variables por medio de estudios longitudinales.

● Perspectivas

La investigación futura en CB y VPH deberá centrarse en la búsqueda de los cofactores que son necesarios para la promoción y progresión carcinogénica y que, en conjunto con la infección por VPH, nos permitan explicar los cambios oncogénicos que se llevan a cabo en la mucosa bucal.

Es necesario llevar a cabo estudios prospectivos y de cohorte, con el fin de establecer el momento en el que el virus se presenta en la mucosa bucal y su permanencia en la misma. Por otro lado, es necesario determinar el papel de la inmunidad hospedera en la mucosa sana y las modificaciones que pudieran estar presentes en la mucosa alterada por procesos malignos.

El desarrollo actual de vacunas en la prevención y tratamiento del cáncer cervical redundará en beneficios para los procesos malignos de las vías aerodigestivas superiores. Estudios practicados en animales, y más recientemente en humanos, indican que la vacunación en contra de la cápside de las proteínas del virus puede prevenir de manera eficiente la infección en forma profiláctica; además, las vacunas terapéuticas están bajo investigación con el propósito de promover regresión de los tumores inducidos por virus de papiloma humano.⁶⁰

as Referencia

1. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 2005;32:1-6.
2. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27.
3. Zhang B, Laribee RN, Kiernsz M, Roman A. Human papillomavirus type 16 E7 protein increases acetylation of histone H3 in human foreskin keratinocytes. *Virology* 2004;329:189-96.
4. García-Carcancá A, Gariglio PV. Aspectos moleculares de los papilomavirus humanos y su relación con el cáncer cérvico-uterino. *Rev Inv Clin* 1993;45:85-92.
5. Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol* 1991;65:473-8.

6. Ruesch MN, Laimins LA. Initiation of DNA synthesis by human papillomavirus E7 oncoproteins is resistant to p21-mediated inhibition of cyclin E-cdk2 activity. *J Virol* 1997;71:5570-8.
7. Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX. Involvement of intact HPV 16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRB cell cycle control. *Oncogene* 2002;21:1510-7.
8. Dorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005;32:7-15.
9. Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004;78:11451-60.
10. Sang BC, Barbosa MS. Increased E6/E7 transcription in HPV 18-immortalized human keratinocytes results from inactivation of E2 and additional cellular events. *Virology* 1992;189:448-55.
11. Mellin H, Dahlgren L, Munck-Wikland E, Lindholm J, Rabrani H, Kalantari M, et al. Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int J Cancer* 2002;102:152-8.
12. Kuulinen WJ, Chen W, Leivo I, Maikitie 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.
13. Snidjers PJF, van den Brule AJC, Schrijnemakers HFL, Raaphorst PM, Meijer CJ, Walboomers JM. Human papillomavirus type 33 in a tonsillar carcinoma generates its putative E7 mRNA via two E6 transcript species which are terminated at different early region Poly(A) sites. *J Virol* 1992;66:3172-8.
14. Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 2005;32:59-66.
15. Miller CS, White DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82:57-68.
16. Sugiyama M, Kumar Bhawal U, Dohmen 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 Radiol Oral Endod* 2003;95:594-600.
17. D'Souza G, Sugar E, Ruby W, Gravitt P, Gillison M. Analysis of the effect of DNA purification on detection of human papillomavirus in oral rinse samples by PCR. *J Clin Microbiol* 2005;43:5526-35.
18. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* 2005;43:5-11.
19. Reinherzbach TW, Brückmann UG, Heimpfich A, Chekol M, Kündel K, Liebert UG. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. *J Clin Virol* 2004;30:302-8.
20. Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhönen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 1983;12:418-24.
21. Sexton CJ, Proby CM, Banks L, Stables JN, Powell K, Navsaria J, et al. Characterization of factors involved in human papillomavirus type 16-mediated immortalization of oral keratinocytes. *J Gen Virol* 1993;74:755-61.
22. Oda D, Bigler L, Lee P, Blanton R. HPV immortalization of human oral epithelial cells: a model for carcinogenesis. *Exp Cell Res* 1996;226:164-9.
23. Ha PK, Pai SI, Westra WH, Gillison ML, Tong BC, Sidransky D, et al. Real-time quantitative PCR demonstrates low prevalence of human papillomavirus type 16 in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Clin Cancer Res* 2002;8:1203-9.
24. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence of a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:709-20.
25. Mork J, Lie AK, Glatte E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2001;344:1125-31.
26. Chang J, Lin M, Chiang C. High-risk human papillomavirus may have an important role in non-oral habits-associated oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *Am J Clin Pathol* 2003;120:69-16.

27. Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:622-35.
28. Leyva-López AG, Aranda-Flores CE, Conde-González C, Lazcano-Ponce EC. La baja utilidad de la determinación del DNA del VPH en la región distal de la uretra masculina. *Salud Pública Mex* 2003;45:589-93.
29. Giovaneli L, Campisi C, Lama A, Giambalvo O, Osborn J, Margiotta V, et al. Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *J Infect Dis* 2002;185:833-6.
30. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lisowsky J, Kee F, Balaram T, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1772-83.
31. Ibieta BR, Lizano M, Frias-Mendivil M, Barrera JL, Canillo A, Ruiz-Godoy LM, et al. Human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma in a Mexican population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:311-5.
32. Tachezy R, Kiozar J, Saláková M, Smith E, Turek L, Betka J, et al. HPV and other risk factor of oral cavity/oropharyngeal cancer in the Czech Republic. *Oral Dis* 2005;11:181-5.
33. Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klusmann JP, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer* 2003;104:336-44.
34. Strome SE, Savva A, Brisset AE, Gostout BS, Lewis J, Clayton AC, et al. Squamous cell carcinoma of the tonsils: a molecular analysis of HPV associations. *Clin Cancer Res* 2002;8:1093-100.
35. El-Mofty SK, Lu DW. Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA in squamous cell carcinoma of the palatine tonsil, and not the oral cavity, in young patients: a distinct clinicopathologic and molecular disease entity. *Am J Surg Pathol* 2003;27:1463-70.
36. Halkamp HC, Mann JJ, Speel EJ. Role of human papillomavirus in the development of head and neck squamous cell carcinomas. *Acta Otolaryngol* 2004;124:520-6.
37. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klusmann JP, Lee JH, Wang D, et al. Age, sexual behaviour and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2004;108:766-772.
38. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner WT, Aebbersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx—a radiosensitive group of head and neck carcinoma. *Cancer* 2001;92:805-13.
39. Sisk EA, Bradford CR, Jacob A, Yian CH, Staton KM, Tang G, et al. Human papillomavirus infection in "young" versus "old" patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 2000;22:649-57.
40. Sugerman PB, Shillito E. The high risk human papillomavirus and oral cancer: evidence for and against a causal relationship. *Oral Dis* 1997;3:130-47.
41. Steinberg BM, DiLorenzo TP. A possible role for human papillomaviruses in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1996;15:91-112.
42. Fouret P, Monceaux G, Ternam S, Lacourte L, St Guily JL. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinomas in nonsmokers. *Acta Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:513-6.
43. Smith EM, Hoffman HT, Summersgill KS, Kirchner L, Turek LP, Haugen TH. Human papillomavirus and risk of oral cancer. *Laryngoscope* 1998;108:1098-103.
44. Mellin H, Friesland S, Lowensohn R, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer* 2000;89:300-4.
45. Koch WM, Lango M, Sewell ID, Zahurak M, Sidransky D. Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity. *Laryngoscope* 1999;109:1544-51.
46. Dahlgren L, Dahlstrand HM, Lindquist D, Högmö A, Björnestal L, Lindholm J, et al. Human papillomavirus is more common in base of tongue than in mobile tongue cancer and is a favourable prognostic factor in base of tongue cancer patients. *Int J Cancer* 2004;112:1015-9.
47. Scully C. Oral squamous cell carcinoma: from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncol* 2002;38:227-34.
48. Watts DH, Koutsky LA, Holmes KK, Goldman D, Kuypers J, Kiviat N, et al. Low risk of perinatal transmission of human papillomavirus.

- results from a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:365-73.
49. Koch A, Hansen SV, Nielsen NM, Palefsky J, Melbye M. HPV detection in children prior to sexual debut. *Int J Cancer* 1997;73:621-4.
 50. Schwartz 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 papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1626-36.
 51. Hemminki K, Dong C, Frisch M. Tonsillar and other upper aerodigestive tract cancers among cervical cancer patients and their husbands. *Eur J Cancer Prev* 2000;9:433-7.
 52. Haraf DJ, Nodzenski E, Brachman D, Mick R, Montag A, Graves D, et al. Human papilloma virus and p53 in head and neck cancer: clinical correlates and survival. *Clin Cancer Res* 1996;2:755-62.
 53. Dai M, Clifford GM, le Calvez F, Castellsagué X, Snijders PJF, Pawlita M, et al. Human papillomavirus type 16 and TP63 mutation in oral cancer: matched analysis of the IARC multicenter study. *Cancer Res* 2004;64:468-71.
 54. Van Houten VMM, Snijders PJF, van den Brekel MWM, Kummer JA, Meijer CJLM, Van Leeuwen B, et al. Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001;93:232-5.
 55. Wiest T, Schwartz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX. Involvement of HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRB cell cycle control. *Oncogene* 2002;21:1510-7.
 56. Anderson JA, Irish JC, McLachlin CM, Ngan BY. H-ras oncogene mutation and human papillomavirus infection in oral carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120:755-60.
 57. Li W, Thompson CH, O'Brien CJ, McNeil EB, Scolyer RA, Cossart YE, et al. Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous cell carcinoma of the tonsil. *Int J Cancer* 2003;106:553-8.
 58. Higa M, Kinjo T, Kamiyama K, Chinen K, Iwamasa T, Arasaki A, et al. Epstein-Barr virus (EBV)-related oral squamous cell carcinoma in Okinawa, a subtropical island, in Southern Japan -simultaneously infected with human papillomavirus (HPV). *Oral Oncol* 2003;39:405-14.
 59. Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Kolligs J, Jungehuelsing M, et al. Prevalence, distribution and viral load of human papillomavirus 16 in tonsillar carcinomas. *Cancer* 2001;92:2875-84.
 60. Villa LL. Vacunas contra el virus del papiloma humano y cáncer cervical invasor. *Salud Pública Mex* 2003;45:443-8.