

**“CONCORDANCIA DE LA PRESENCIA DE VIRUS DEL PAPILOMA
HUMANO EN LA MUCOSA BUCAL, OROFARÍNGEA Y DE CUELLO
UTERINO EN MUJERES CON CÁNCER BUCAL”.**

Idónea Comisión de Resultados

Que para obtener el grado de

Maestro en Patología y Medicina Bucal

P R E S E N T A

Esmeralda Rodríguez Alvarado

Comité tutorial:

Codirectora: Dra. Velia A. Ramírez Amador

Codirectora: Dra. I. Gabriela Anaya Saavedra.

Asesor: Dr. Alejandro Manuel García Carrancá.

ABRIL 2013

“La Especialización y Maestría en Patología y Medicina Bucal de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT, además cuenta con el apoyo del mismo consejo con el convenio PFP-20-93”

Agradecimientos

Miembros del Jurado

Dra. Martha Beatriz González Guevara

PRESIDENTE

Dra. Ma. Esther Josefina Irigoyen Camacho

SECRETARIA

M. en C. Miriam Cecilia Guido Jiménez

VOCAL

ÍNDICE

Índice de Cuadros	I
Índice de Figuras	II
1. Marco teórico	10
1.1 Epidemiología del cáncer bucal	11
1.2 Características clínicas del cáncer bucal	11
1.3 Estadificación	12
1.4 Factores de riesgo para el desarrollo del cáncer bucal	13
1.4.1 Tabaco	14
1.4.2 Alcohol	14
1.4.3 Factores genéticos	15
1.4.4 Agentes biológicos	17
1.5 Virus del Papiloma Humano	17
1.5.1 Características biológicas	17
1.5.2 Nomenclatura y clasificación	17
1.5.3 Infección por VPH en cáncer bucal y orofaríngeo	20
1.6 Sobrevida en cáncer bucal y orofaríngeo positivo a VPH	22
1.7 Concordancia de VPH en mucosa de cuello uterino y mucosa bucal	23
2. Planteamiento del problema y justificación	27
3. Objetivos	28

3.1 Objetivo general	28
3.2 Objetivos particulares	28
4. Método	28
4.1 Procedimientos clínicos	29
4.2 Procedimientos de laboratorio	30
4.3 Análisis estadísticos	34
5. Resultados	35
6. Cuadros	37
7. Figuras	44
8. Discusión	46
9. Referencias	54
10. Anexos	60

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Prevalencia de infección por VPH en cáncer bucal y orofaríngeo	37
Cuadro 2. Estudios de prevalencia y concordancia sobre la presencia de VPH en diferentes localizaciones anatómicas	38
Cuadro 3. Características demográficas y clínicas en 10 pacientes con cáncer bucal	39
Cuadro 4. Características clínicas en 10 pacientes con cáncer bucal	40
Cuadro 5. Frecuencia de VPH-16 y 18 en las mucosas bucal, orofaríngea y de cuello uterino en CB.....	41
Cuadro 6. Características demográficas y clínicas en 10 pacientes con cáncer bucal de acuerdo a la presencia de VPH.....	42
Cuadro 7. Concordancia entre la presencia de VPH 16 en mucosa bucal, orofaríngea y de cuello uterino, razones de momios y sus intervalos de confianza al 95%.....	43

Índice de Figuras

Figura 1. Gel de electroforesis de la amplificación del gen β -globina..	44
Figura 2. Gel de electrofororesis de la amplificación de MY09/MY11.....	44
Figura 3. Gel de electrofororesis de la amplificación de GP5+/6+.	45
Figura 4. Electroferograma de muestra de cancer bucal positivo a VPH-16.....	45

Resumen

Introducción. Diversos estudios han sugerido que la infección por VPH es un factor de riesgo para el desarrollo de CByO; Asimismo, se ha reportado la presencia de VPH concurrente en mucosa bucal y genital; sin embargo, en pacientes con cáncer bucal, no existe información sobre infección concurrente y posibles vías de transmisión.

Objetivo. Establecer la concordancia entre la presencia de VPH en la mucosa bucal, orofaríngea y cervicouterina de mujeres afectadas con cáncer bucal.

Método. Estudio transversal, observacional y analítico, en el que se incluyeron mujeres con cáncer bucal (CB) que acudían al Instituto Nacional de Cancerología (INCan). Previo consentimiento informado, se realizó un examen y un cepillado citológico de la lesión, de la mucosa orofaríngea y del cuello uterino. Se extrajo y cuantificó el ADN y se sometió a amplificación a través de oligonucleótidos específicos. Se realizaron pruebas estadísticas (χ^2 y exacta de Fisher) y se calculó la kappa de Cohen.

Resultados. Se incluyeron 10 mujeres con CB con una mediana de (61.5 [Q₁-Q₃:51.7-76.2] años); 2 (20%) refirieron antecedentes heredofamiliares de cáncer, dos más (20%) fumaban, y ninguna refirió consumo o historia de consumo de alcohol. En 6 (60%) casos se amplificó VPH-AR en la mucosa bucal. Siete 7 (70%) pacientes presentaron VPH-AR en mucosa bucal y orofaríngea simultáneamente, 6 correspondientes a VPH-16 y una a VPH-18. Cuatro mujeres (40%) de ellas presentaron simultáneamente VPH-AR en mucosa bucal/orofaríngea y cuello uterino (VPH 16).

Conclusiones. La alta prevalencia de VPH-AR en CB, así como a alta concordancia de VPH-16 encontrado en más de una localización mucosa en las pacientes con CB puede sugerir autoinoculación, transmisión sexual, y un sistema inmunológico debilitado.

1. MARCO TEÓRICO

De acuerdo a la Organización Mundial de Salud (OMS), el cáncer es la principal causa de muerte en los países económicamente desarrollados y la segunda en los países en desarrollo (WHO, 2008). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) estimó que para el año 2008, a nivel mundial, existían 12.7 millones de personas afectadas por cáncer, y 7.6 millones de muertes por esta causa, con ligero predominio en países en vías de desarrollo (Jemal y cols., 2011).

El cáncer es una enfermedad causada por cambios citogenéticos que progresan a través de una secuencia de mutaciones somáticas de genes específicos que resultan en una proliferación celular descontrolada (Ram y cols., 2011).

1.1 Epidemiología del cáncer bucal

El cáncer de cabeza y cuello es la sexta neoplasia más frecuente en el mundo, cada año se diagnostican aproximadamente de 350,000 a 400,000 casos en el mundo, este representa la sexta neoplasia maligna más común (Ferlay y cols., 2010).

Para el año se estimaron 263,900 nuevos casos de cáncer bucal en el mundo, y 128,000 muertes atribuibles a él (Jemal y cols., 2011); observándose un incremento en varios países de Europa y Estados Unidos en las últimas dos décadas (de 18% en 1973 a 31% en 2004) (Jemal A. y cols., 2011). La incidencia más alta de cáncer bucal se encuentra en Malasia, sur de Asia y Europa del este debido al hábito de masticar tabaco (Ferlay y cols., 2010).

En México, de acuerdo con el registro histopatológico de neoplasias malignas, en el año 2002 se reportaron 820 casos de cáncer bucal y 147 de cáncer orofaríngeo, lo que

representó el 1% del total de neoplasias malignas. Posteriormente, en el reporte bienal 2004-2006, se registraron 10,064 casos, el 0.78% correspondían a cáncer bucal y 0.13% a cáncer orofaríngeo (0.91% de casos de CB de todas las neoplasias malignas) (RHNM 2004-2006).

Si bien, en nuestro país no existen sistemas de información estadística sobre las enfermedades, se han realizado esfuerzos importantes en busca de información sobre la frecuencia y mortalidad del cáncer bucal. Un estudio basado en la mortalidad por cáncer bucal en México, (Anaya-Saavedra y cols., 2008) indicó que de 1979 a 2003 el total de muertes causadas por cáncer bucal y orofaríngeo fue de 15 576, en el cual concluyen que aunque en países como Europa y Asia la mortalidad ha aumentado, las cifras de mortalidad en el país permanecen estables.

En cuanto al sexo y la edad de presentación, diversos reportes han sugerido que en las últimas dos décadas, la incidencia de CB ha aumentado entre las mujeres a razón de 1.5:1, (Patel, 2011; Shiboski, 2005; Schantz, 2002;) particularmente en aquellas sin antecedentes de consumo de tabaco y/o alcohol (Patel, 2011; Hockin, 2011; Toner y Reagen, 2009). Asimismo, datos recientes sugieren que la incidencia de cáncer bucal en mujeres jóvenes (15-39 años) ha aumentado, atribuyendo este hallazgo al aumento en el número de parejas sexuales, el incremento en las prácticas sexuales orogenitales y la consecuente transmisión del VPH (Bleyer, 2009; Llewellyna, 2004).

1.2 Características clínicas del cáncer bucal

El carcinoma escamocelular representa la neoplasia maligna más común (90%) de la mucosa bucal, el resto lo constituyen linfomas, sarcomas, melanomas, y metástasis de otras regiones (Kruse y cols., 2010).

La presentación clínica más frecuente del carcinoma escamocelular es el aumento de volumen exofítico ulcerado, aunque pueden presentarse como placa y/o ulcera de bordes indurados (Falaki y cols., 2011). Los tres sitios de presentación más frecuente son los bordes laterales de la lengua (30%) y el piso de la boca (14%) (Falaki y cols., 2011; Yoshimoto y cols., 2007; Shiboski, 2000; Ramirez-Amador y cols., 1995).

1.3 Estadificación del cáncer bucal

Para facilitar el seguimiento clínico y terapéutico se realiza la estadificación del cancer bucal, se utiliza el sistema TNM (Anexo 1), el cual evalúa tres características: el tamaño del tumor (T), T1: Tumor menor o igual a 2 cm; T2: Tumor mayor de 2 cm pero menor de 4 cm; T3: Tumor mayor de 4 cm; T4: El tumor invade estructuras adyacentes. la presencia de nódulos linfáticos (N), N0: No hay metástasis ganglionares; N1: Hay metástasis en un ganglio linfático homolateral menor o igual a 3 cm; N2a: Metástasis en un ganglio homolateral mayor de 3 cm pero menor de 6; N2b: Metástasis en múltiples ganglios homolaterales, menores de 6 cm; N3. Metástasis en un ganglio linfático mayor de 6 cm y la presencia de metástasis (M), M0: No hay metástasis a distancia. M1: Hay metástasis a distancia. De acuerdo con la última revisión de la AJCC se incorpora al sistema de estadificación TNM, el grado histológico y el estado del paciente. Histológicamente, el sistema de gradificación de la OMS recomienda 3 categorías: bien diferenciado, moderadamente diferenciado y poco diferenciado; para lo cual se analizan características como el grado de queratinización, el pleomorfismo celular y nuclear, y la actividad mitótica (Woolgar, 2006).

Sobrevida. Se han implicado muchos parámetros clinicopatológicos en el pronóstico, recurrencia y sobrevida del cáncer bucal. El pronóstico depende de varios factores como

la edad, el sexo, co-morbilidades, el consumo de tabaco y alcohol, y otros directamente relacionados con la neoplasia como la localización y los márgenes quirúrgicos (Jeries, 2010; Garzino, 2006).

Los carcinomas de orofaringe son diagnosticados usualmente en estadios avanzados, en especial los de la base de la lengua. La progresión asintomática de estas lesiones, lo difícil que es explorar esta zona y la abundancia del drenaje linfático, son algunas de las causas que hacen que la mayoría de estos tumores sean diagnosticados en la mayoría de los casos en estadio IV (Seoane, 2012). La invasión extracapsular se ha identificado como un factor predictivo de recurrencia regional y metástasis distantes (Fedele, 2009; Myers, 2001). La supervivencia del CB varía de 81% a 5 años, en los pacientes con enfermedad localizada, 42% a 5 años cuando la enfermedad es regional, y disminuye hasta 17% cuando existen metástasis (Fedele, 2009).

En cuanto al tratamiento, en estadios tempranos de la enfermedad (etapas I y II) el tratamiento quirúrgico conservador, con o sin radioterapia, permite conservar una adecuada preservación anatómica y funcional (Diaz, 2010; Schantz, 2002). En contraste, en los pacientes en estadios avanzados existen diferentes modalidades terapéuticas como el tratamiento quirúrgico (el cual es en la mayoría de las ocasiones mutilante), con o sin radio y/o quimioterapia (Haightz, 2009).

1.4 Factores de riesgo para el desarrollo de CB

Si bien el consumo prolongado de tabaco y alcohol han sido reconocidos como los dos principales factores de riesgo en el desarrollo de cáncer bucal (Castellsague, 2004; Johnson, 2001), en los últimos años se han reportado aumento en la incidencia de CB en menores de 40 años (Shiboski, 2005), particularmente sin antecedentes de consumo de tabaco y alcohol (Chi, 2009; Toner y cols., 2009), por lo que se ha sugerido otros

factores, como deficiencias nutricionales (Nasim, Ismail, 2007), factores genéticos (Pfeiffer, 2011) y la presencia de VPH en la mucosa bucal, pudieran ser factores de riesgo (Lajer y cols., 2012; Mork y cols., 2011; Toner y cols., 2009; Anaya-Saavedra y cols., 2008; Romanitan y cols., 2008; Conway y cols., 2007; Shiboski y cols., 2005; Ha, Califano, 2004; Gillison, 2004).

1.4.1 Tabaco

El tabaco contiene más de 300 compuestos carcinogénicos que se convierten en metabolitos activos capaces de interactuar con el ADN mediante la acción de las enzimas oxidativas. La acción carcinogénica depende principalmente de los hidrocarburos policíclicos aromáticos, nitrosamidas, níquel, y cadmio, además de la exposición continua al calor producido por la combustión del tabaco (Johnson N. 2001).

Los bordes postero-laterales de la lengua y el piso de la boca se consideran como sitios de alto riesgo, pues por su localización anatómica, reciben las concentraciones más altas del tabaco inhalado, por lo tanto son más susceptibles a sus efectos carcinógenos (Schmidt B. 2004).

1.4.2 Alcohol

El alcohol se considera un agente promotor del CB debido a su capacidad para permitir que el epitelio bucal se haga más permeable y facilite así la acción de carcinogénicos; así mismo, actúa como facilitador de los carcinogénicos (como los productos del tabaco) hacia el interior de la célula, y como factor irritante local por su efecto oxidativo directo en el epitelio (Zygoniani, 2011; Toner, 2009; Castellsague, 2004).

Se ha reconocido una fuerte asociación entre el uso excesivo de alcohol y tabaco,

aproximadamente el 80% de los pacientes consumidores de alcohol y refieren consumir tabaco también (Johnson N. 2001). El mecanismo celular al combinar el alcohol y tabaco es poco entendido, sin embargo, se sabe que está alterado el proceso de oxidación/antioxidación y en esto está involucrado el sistema citocromo P450m esta es una enzima que se expresa en el hígado y se sabe que interviene en el metabolismo de las drogas, compuestos endógenos, sustancias ambientales y de la dieta (Jayapriyaa y cols., 2010).

Se sabe que hay interacción significativa entre el consumo de alcohol y la deficiencia de folatos, esto debido a que el metabolismo del acetaldehído se realiza localmente en la cavidad bucal eliminando los folatos y por lo tanto su efecto, lo que puede aumentar el riesgo de CB sistémica y localmente por la disrupción en la síntesis de ADN, reparación, de las células epiteliales (Jayapriyaa y cols., 2010).

El carcinoma escamocelular es una neoplasia que se desarrolla como un proceso multietapas de daño genético acumulativo en las células epiteliales (Lars, 2000). Hay literatura que sostiene que se deben investigar otros factores de riesgo además del alcohol y tabaco, ya que en ausencia de estos factores ya conocidos, el cáncer se presenta en pacientes más jóvenes, por lo que es importante examinar otros potenciales factores de riesgo tales como alteraciones genéticas, historia familiar de cáncer, infección viral (Zygianni y cols., 2011).

1.4.3 Factores genéticos

Se han estudiado las alteraciones genéticas como factor de riesgo en el desarrollo del cáncer, estas definen las bases moleculares de la carcinogénesis, las cuales incluyen mutaciones, amplificaciones, rearrreglos y deleciones del ADN, que pueden contribuir a

la susceptibilidad genética para desarrollar carcinoma escamocelular de cabeza y cuello. (Kostrzewska, 2012; Ferreira, 2012; Pfeiffer, 2011; Ram, 2011) lo que lleva a la pérdida de función de diversos genes supresores tumorales o activación de oncogenes, estos cambios acumulativos pueden producir atipia y eventualmente cáncer (Ferreira, 2012; Pfeiffer, 2011).

La mayor modificación epigenética en los tumores es la metilación, las modificaciones epigenéticas están conectadas frecuentemente con la pérdida de expresión genética y la importancia de los múltiples e indispensables eventos genéticos durante la carcinogénesis (Ram, 2011).

Las variaciones genéticas de los mecanismos protectores contra el cancer pueden estar implicados en la carcinogenesis, tales mecanismos protectores pueden fallar y por lo tanto predisponer al al desarrollo del cáncer, entre estos los genes para las enzimas hepáticas, que degradan los carcinógenos químicos, los genes capaces de reparar las mutaciones del ADN, los genes que controlan el crecimiento descontrolado de las células cancerígenas o los genes relacionados con la protección inmune (Scully, 2010).

En cuanto a la susceptibilidad genética, se ha encontrado en cerca del 10% de los casos de CB un fuerte componente hereditario (Ram y cols., 2011). Un trabajo realizado por Wiklund y cols., (2011) encontró disregulaciones en el mARN asociado con ADN metilado en pacientes con CB en contraste con una expresión normal en estroma y epitelio sano.

1.4.4 Agentes biológicos

Entre los agentes biológicos involucrados con el desarrollo de CB, se ha propuesto la presencia de diversos microorganismos, ejemplo de ello es el Virus de Epstein Barr en neoplasias linfoproliferativas, el virus del herpes simple tipo 8 (VHS-8) en el sarcoma de Kaposi y el virus del papiloma humano en las neoplasias epiteliales.

Los virus son capaces de alterar el funcionamiento celular y modificar el ADN y las estructuras cromosómicas e inducir cambios proliferativos en las células. La integración del ADN de algunos de estos virus en el genoma humano, se asocia con la expresión de oncogenes y la disregulación de los genes supresores tumorales, otros contribuyen de manera indirecta en la progresión tumoral (Lars y cols., 2000).

1.5 Infección por Virus del Papiloma Humano (VPH).

1.5.1 Nomenclatura y clasificación

Los papilomavirus son virus epiteliotrópicos presentes en la piel y mucosas de muchos animales; en los humanos, se han descrito más de 200 tipos y se han dividido en virus de bajo riesgo (VPH 6,11,42,43 y 44) y alto riesgo (VPH 16,18,31,33,35,45,51,52 y 56), de acuerdo a su presencia en lesiones malignas del cuello uterino (Faridi R. 2011).

1.5.2 Biología de los papilomavirus

Los papilomavirus humanos son pequeños virus de ADN de doble cadena circular que contiene 8000 pares de bases, el genoma contiene una región del control de aproximadamente 1000 pb, en la que se han identificado secuencias estimuladoras así como represoras de la transcripción viral, así como el origen de la replicación (Munger, 2004).

El VPH tiene una cápside proteica y al igual que otros virus, aprovechan la maquinaria celular para replicarse, son epiteliotrópicos y una vez que alcanzan las células basales pueden permanecer en forma episomal o en estado latente, o bien, abandonar esa latencia y aprovechar la diferenciación celular propia del epitelio. Paralelamente a la maduración del epitelio cervical, el virus expresa sus genes de forma secuencial; en primer lugar los genes tempranos en las capas basales y posteriormente en las capas superficiales del epitelio más diferenciado expresan las proteínas tardías (L1 y L2) que forman la cápside y permiten el ensamblaje de nuevas partículas virales que repetirán el ciclo (Miller y cols., 2012).

El VPH infecta las células basales del epitelio a través de microabrasiones de las membranas mucosas, las partículas virales formadas migran cuando las células basales se van diferenciando y se desprenden de ellas cuando las células alcanzan las células más superficiales del epitelio (Gillespie, 2009).

En determinadas circunstancias fisiológicas de permisividad inmunológica y tras un periodo de persistencia de la infección, generalmente largo, las partículas de ADN episomal sufren un proceso de integración dentro del genoma celular y con ello una serie de acontecimientos que conducen a un proceso de bloqueo de proteínas con funciones importantes en el ciclo celular (p53 y Rb) y como consecuencia, alteraciones en el crecimiento normal y diferenciación del epitelio cervical seguidas de un acumulo de errores genéticos que son la base de la transformación tumoral bucal (Miller y cols., 2012).

El genoma de los diferentes tipos virales presenta una estructura básica muy similar, con homología de secuencia entre ellos. Se han identificado marcos de lectura abierta

organizados en regiones de expresión temprana (E) y tardía (L), los primeros codifican para proteínas relacionadas con la replicación (E1), transcripción (E2) y transformación celular (E6 y E7) (Premoli, 2005).

El potencial oncogénico del VPH de alto riesgo (VPH-AR) se atribuye a la inserción específica de fragmentos de ADN (E6 y E7) en la célula. Como resultado de esta integración, se suprimen algunas funciones clave que causan alteraciones en el mecanismo de la apoptosis, reparación del ADN, regulación del ciclo celular y finalmente llevan a la inmortalización celular (Nair, Pillai, 2005). La integración del genoma del VPH, al contrario de la presencia de VPH episomal, está asociado con la gran frecuencia de neoplasia de cuello uterino, el significado patológico de la integración aún no es completamente claro, pues frecuentemente se encuentra en ambas formas (Feller, 2010).

La proteína E2 reprime la transcripción de E6 y E7, esto tiene como resultado la reactivación de p53 y Rb que son supresores tumorales que controlan la proliferación celular y por lo tanto el control de la proliferación celular desaparece rápidamente. El efecto de la represión de los oncogenes E6 y E7 en el fenotipo transformado de líneas celulares de cáncer cabeza y cuello VPH positivos aún no se ha determinado. La exposición continua de E6 y E7 es necesaria para mantener el estado proliferativo de células cancerígenas en el cáncer bucal y/ orofaríngeo relacionado con VPH AR (Badulescu y cols., 2010).

El VPH se ha encontrado integrado al ADN hospedero en 48% de los casos de CByO, 35% de forma episomal y 17% de ambas formas (Koshinen, 2003).

1.5.3 Infección por VPH en cáncer bucal y orofaríngeo

Los datos sobre la prevalencia de infección por VPH en el cáncer bucal y orofaríngeo son abundantes y divergentes (Pannone, 2011; Lopes, 2011). Como se muestra en el Cuadro 1, desde las primeras observaciones de Syrjänen y cols., en 1983, se han publicado numerosos estudios sobre su frecuencia en CByO, con frecuencias que van de 0% a 100% (Pannone, 2011; López, 2011; Hansson, 2005; Mork, 2001).

Con relación a la la frecuencia de VPH en CB se ha reportado de 4% a 80% (Machado y cols., 2010; Termine y cols., 2008; Zhao y cols., 2003). Se han realizado diversos meta-análisis de la prevalencia de VPH en cáncer bucal que han reportado cifras variables que van desde 21.5 hasta 34.5% (O'Rorke y cols., 2012; Jayaprakash y cols., 2011; Termine y cols., 2011; Dayyani y cols., 2010).

De acuerdo con Kreimer y cols., (2005) la prevalencia de VPH es inversamente proporcional al tamaño de la muestra estudiada. Una de las prevalencias más bajas de VPH en cáncer bucal (3.9%), proviene de un estudio multicéntrico realizado en nueve países, en el que se incluyeron 1600 casos y 1700 controles (Herrero, 2003). El lugar geográfico es un factor relevante en las frecuencias informadas: en el cáncer bucal, la prevalencia de VPH en Asia (33%) es más alta que en Europa (16%) y Norteamérica (16.1%) (Kreimer, 2005). Por otra parte, la frecuencia de VPH en cáncer orofaríngeo es mayor en Norteamérica y Asia (47.0 y 46.3%, respectivamente), que en Europa (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, 2005).

En un meta-análisis que examinó de manera independiente 94 estudios de cáncer bucal y VPH, se informa que la presencia viral es 4.7 veces más común en los pacientes con cáncer bucal, que en individuos sin alteraciones bucales (Miller, 2001). Resultados similares muestran que los individuos con VPH en la mucosa bucal tienen de 3 a 6 veces más riesgo de tener cáncer bucal (Anaya, 2008; Ha, Califano, 2004; Smith, 2007). En un estudio de casos y controles poblacional, realizado en Suiza, se informa que los individuos con VPH-AR tienen un riesgo 63 veces mayor de presentar cáncer bucal (RM= 63 IC 95%, 14-480). A nivel mundial, en la última década, la frecuencia de VPH en CB se ha reportado de 4% a 80% (Machado y cols., 2010; Termine y cols., 2008). Adicionalmente, diversos meta-análisis de la prevalencia de VPH en cáncer bucal han informado cifras que van desde 21.5% hasta 34.5% (O'Rorke y cols., 2012; Jayaprakash y cols., 2011; Termine y cols., 2011; Dayyani y cols., 2010).

En México, dos estudios realizados en el Instituto Nacional de Cancerología reportan prevalencias de 42% (Ibieta, 2005) y 43.5% (Anaya, 2008). En una revisión sistemática de la literatura, 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) (González-Ramírez y cols., 2013; Ibieta y cols., 2012; Kreimer, 2005).

El sitio en el que se presenta la lesión es determinante, actualmente se reconoce que la zona amigdalina, la orofaringe y la base de la lengua, son más susceptibles a la acción oncogénica viral, Tachezy y cols., 2005 encontraron frecuencias menores para VPH en cáncer bucal (25%) que en orofaríngeo (57%) (Tachezy y cols., 2005).

1.6 Sobrevida en cáncer bucal y orofaríngeo positivo a VPH

Numerosos trabajos han identificado que el CByO que contiene secuencias de VPH presenta un mejor pronóstico y respuesta a tratamiento (Pignon y cols., 2009; Junor y cols., 2012; Ang y cols., 2010). Aunque el mecanismo es poco claro, estas diferencias podrían explicarse porque en las células tumorales asociadas a VPH aumenta la sensibilidad a la quimioterapia y radioterapia (Junor y cols., 2012).

En un meta-análisis se reportó que los pacientes con cáncer orofaríngeo VPH+ tienen 28% menos de riesgo de muerte y 49% menos de posibilidad de falla al tratamiento, comparados con los pacientes VPH negativos (Pignon y cols., 2009).

A este respecto, se ha observado que los tumores VPH positivos son entidades biológicas diferentes a los VPH negativos; con diferentes vías carcinogénicas, y con diferente comportamiento biológico. La alta frecuencia de mutación del gen p53 encontrada en los tumores VPH negativos, pudiera estar relacionada con la cancerización de campo y por lo tanto, con recurrencia temprana, tumores secundarios, y peor respuesta a la quimioterapia y radioterapia (Grimminger, Danenberg, 2011). Lo anterior, apoya la utilidad clínica de la identificación de VPH en el CByO (Huang y cols., 2012; Schache y cols., 2011; Gillison y cols., 2009; Fakhry y cols., 2008).

Es relevante mencionar el trabajo realizado por Du y cols., (2012) mencionan que a pesar de que se identifique el mismo tipo viral, es necesario el estudio de las variantes de cada uno de ellos. Ejemplo de lo anterior es la variante R10G del VPH-16, más común en boca que en mucosa cervicouterina; por lo que es posible sea mayor su capacidad de persistencia en esa localización anatómica (Du y cols., 2012).

1.7 Concordancia de VPH en mucosa bucal, orofaríngea y cervicouterina

Como se puede observar en el Cuadro 2, diversos estudios han estudiado la presencia del VPH en mucosa bucal y mucosa de cuello uterino, en mujeres sanas, embarazadas, con inmunodeficiencias, o con lesiones benignas o malignas del cuello uterino (Beder-Ribeiro y cols., 2013; Adamopoulou y cols., 2013; De Guglielmo y cols., 2013; Koshima y cols., 2012; Zonta y cols., 2012; Abdelbaset y cols., 2012; Termine y cols., 2011; Matsushita y cols., 2011; Saini y cols., 2010; Termine y cols., 2009; Castellsague y cols., 2009; Marais y cols., 2008; D'Souza y cols., 2007; Fakhry y cols., 2006; Rintala y cols., 2005; Smith y cols., 2004; Cañadas y cols., 2004; Badaraco y cols., 1998; Kellokoski y cols., 1992).

Un meta-análisis realizado por Termine y cols., (2011), incluyó 10 estudios sobre concordancia de VPH en boca y cuello uterino, indicando que el 21.4% de las muestras analizadas presentaban infección simultánea (bucal y cervicouterina). Los resultados muestran que la infección por VIH es uno de los factores más importantes en la alta concordancia encontrada, por lo que se concluye que la inmunidad juega un papel importante en la presencia y persistencia del VPH (Termine y cols., 2011).

Las frecuencias encontradas en la mucosa bucal de mujeres sin lesiones en cuello uterino han variado de 1.4% (Termine y cols., 2009) a 54.8% (Beder-Ribeiro y cols., 2013). Un estudio reciente realizado en Grecia (Adamopoulou y cols., 2013), encontró una prevalencia de infección por VPH de 60.5% en mucosa cervicouterina y de 44.2% en mucosa bucal; 11.6% tuvieron VPH-16 en ambas localizaciones. Las altas frecuencias encontradas en la mucosa bucal de mujeres aparentemente sanas, puede deberse a infección por VPH o lesiones genitales en las parejas de estas mujeres, por lo cual, la transmisión sexual representa una vía importante de llegada del virus a la mucosa bucal (Beder-Ribeiro y cols., 2013).

En contraste con lo anterior, la baja frecuencia de VPH en la mucosa bucal de los estudios realizados en sexoservidoras (6.1 a 7.9%) (Matsushita y cols., 2011; Cañadas y cols., 2004), sugiere el uso de métodos de control de infecciones en estas mujeres. Cañadas y cols., (2004) encontraron una prevalencia de 27.8% en mucosa cervical, 26.1% en mucosa vaginal, 22.9% en mucosa vulvar, 15% en mucosa anal y 7.9% en mucosa bucal. El valor de kappa para la concordancia entre los tipos encontrados en mucosa cervicouterina mucosa bucal fue de 0.72. Otro trabajo realizado en 196 sexoservidoras de Japón (Matsushita, 2011), encontró una frecuencia de VPH-AR de 6.1% de la mucosa bucal y 52.6% en mucosa cervicouterina; seis mujeres presentaron infección simultánea en ambas mucosas, y solamente 2 (1.0%) tuvieron el mismo tipo de VPH en ambas mucosas (VPH-56).

Los trabajos realizados en mujeres que se conocen con infección genital por VPH muestran frecuencias que varían de 3.8% (Kellokoski y cols., 1992) a 48.3% (de Guglielmo y cols., 2013).

Los estudios realizados en mujeres embarazadas se enfocan más a la detección de VPH en el cuello uterino de la mujer y en la presencia del virus en la mucosa bucal del neonato (Castellsague y cols., 2009; Smith y cols., 2004).

La frecuencia de VPH en cuello uterino al momento del parto varía de 16.4% (Koshima y cols., 2004) a 46.2% (Castellsague y cols., 2009), y en la mucosa bucal de los neonatos de 14.0% (Rintala y cols., 2005) a 51.6% (Castellsague y cols., 2009). Únicamente un trabajo (Smith y cols., 2004), que incluyó a 577 mujeres embarazadas, evaluó la presencia de VPH en la mucosa bucal de las mujeres embarazadas, encontrando una prevalencia de VPH de 2.4% en la mucosa bucal y 29% en mucosa

cervical, solo seis mujeres (1%) presentaron infección en ambas mucosas de forma simultánea, sin embargo ninguna de ellas tenía el mismo tipo de VPH (Smith y cols., 2004).

Koshima y cols., (2012) encontraron una frecuencia de VPH de 16.4% de infección por VPH en la mucosa cervical de las mujeres embarazadas, y del 17.9% en la mucosa bucal de los neonatos, con un valor de kappa de 0.99 (Koshima y cols., 2012). De manera similar, un estudio de 36 meses de seguimiento en recién nacidos (Rintala y cols., 2005) encontró infección por VPH en la mucosa bucal del 14% de los neonatos y 15% en la mucosa genital (4%-15%).

En las mujeres infectadas con VIH, la frecuencia de VPH en mucosa bucal varía de 25.2% (Fakhry y cols. 2006) a 33% (Marais y cols. 2008). En un trabajo en el cual se comparó la prevalencia y tipo de VPH encontrado en mucosa bucal y cervical en 172 mujeres VIH positivas y 86 VIH negativas, se identificó que el 6.3% de las 35 mujeres VPH positivas tuvieron infección concurrente en ambas mucosas, sin embargo, fueron diferente tipos (Fakhry y cols., 2006). D´ Souza y cols., (2007) analizó la presencia y persistencia de infección por VPH en mucosa bucal y cervicouterina en 136 mujeres VIH positivas y 63 negativas, durante un seguimiento de 6 meses, se encontró una prevalencia de 33% y 78% (mucosa bucal y cervicouterina, respectivamente) en las pacientes VIH+ y de 15% y 51% en las pacientes sin VIH (mucosa bucal y cervicouterina, respectivamente), siendo el VPH-16 fue el de mayor frecuencia, sin embargo no se analizó la concordancia entre los tipos encontrados en ambas mucosas (D´ Souza y cols., 2007).

En los estudios que analizan la mucosa bucal de mujeres con lesiones genitales por

VPH, la frecuencia de VPH varía de 0.5% (Zonta y cols. 2012) a 5.7% (Saini y cols., 2010), este último trabajo realizado en mujeres con cáncer cervicouterino. Un trabajo realizado en 29 mujeres con lesión benigna por VPH en mucosa cervicouterina, encontraron una prevalencia de 37.9% de infección en la cavidad bucal y 34.5% en el tracto genital, el VPH-16 fue el mas frecuente (34.6%); Se encontró infección simultanea en 5 pacientes, 3 de ellos con el mismo tipo viral (VPH-16), por lo tanto, conluyen aunque alta prevalencia, la concordancia parcial entre ellos, pueden sugerir que ambas mucosas sean reservorios diferentes para diferentes tipos de VPH (Badaraco y cols., 1998). En un trabajo en Sudán que incluyó 40 mujeres con lesión intraepitelial por VPH (Aldelbaset y cols. 2012), encontraron una frecuencia de 40% en la mucosa cervicouterina, (VPH-16 en el 50%), y solamente 1 muestra (2.5%) de mucosa bucal fue positiva para VPH. Finalmente, el único trabajo que analiza la presencia de VPH en la boca de 70 mujeres con CaCu (Saini y cols., 2010), indica que la frecuencia de infección por VPH en la mucosa bucal es de 5.7%.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

En las últimas dos décadas, el papel del VPH en el desarrollo del cáncer orofaríngeo y amigdalino ha comenzado a cobrar valor gracias a la gran cantidad de evidencia científica acumulada; (De Stefani y cols., 2013; Zandberg cols., 2013; Rautava, Syrjänen S, 2012); sin embargo, y a pesar de los numerosos trabajos al respecto, su papel en la carcinogénesis bucal continúa siendo controversial (Kansy y cols., 2012).

Un número importante de estudios ha analizado la infección por VPH en la mucosa bucal y el cuello uterino en forma concurrente en una misma población de estudio, como mujeres embarazadas (Smith y cols., 2004), mujeres con infección por VIH (Marais y cols., 2008; Fakhry y cols., 2006) y mujeres con lesión en cuello uterino (de bajo y alto grado de malignidad) (Sánchez y cols., 2010; Peixoto y cols., 2011; Abdelbaset y cols., 2012). Sin embargo, en mujeres con cáncer bucal, no existen estudios acerca de la prevalencia de infección concurrente por VPH en mucosa bucal, orofaríngea y cervicouterina y si los tipos virales son concordantes.

El presente estudio está dirigido a la identificación de la infección por VPH en la mucosa bucal, orofaríngea y de cuello uterino en mujeres con cáncer bucal, mediante la realización de purificación y amplificación simultánea de ADN (bucal, orofaríngeo y cervical). La evaluación concurrente de HPV en ambas mucosas aportará información acerca de las diferencias y similitudes entre la infección en tres sitios anatómicos diferentes, y su posible asociación con las variables consideradas de importancia en procesos oncogénicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Establecer la concordancia entre los tipos de VPH identificados en la mucosa bucal y orofaríngea, con los del cuello uterino, en mujeres con cáncer bucal.

3.2 Objetivos Particulares

- Estimar la asociación de la infección por VPH-AR con la presencia de CB.
- Estimar la concordancia en las secuencias genómicas de tipos específicos de VPH obtenidos en muestras de la mucosa bucal, orofaríngea y de cuello uterino.

4. MÉTODO

Estudio transversal, observacional y analítico, que se desarrolló de enero de 2010 a junio de 2011, en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan), con colaboración de la UAM-Xochimilco. El estudio fue aprobado por los Comités Institucionales de Bioética de las instituciones participantes. Las mujeres participantes en el estudio fueron incluidas en el Departamento de Cabeza y Cuello del INCan, previo consentimiento informado.

Criterios de inclusión:

- Mujeres mayores de 18 años, con capacidad de decisión propia, con diagnóstico histológico de CB que no hayan recibido tratamiento médico previo (cirugía, quimioterapia y/o radioterapia)
- Aceptación de participación en el estudio y firma de la carta de consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- Mujeres con CB tratadas previamente (cirugía, radio y/o quimioterapia)
- Mujeres con melanoma, linfoma o sarcoma bucal
- Mujeres que no aceptaron participar en el estudio

Se pidió a la persona leer la carta de consentimiento informado (Anexo 2) y se contestó a cualquier duda que tuvo sobre el estudio. Se pidió que firmara la carta de consentimiento si estuvo de acuerdo en participar en el estudio. Se le hizo saber al paciente que la negativa en relación a su participación en el estudio no tenía consecuencias negativas en la atención médica recibida en la institución que acudió para consulta. Posteriormente, se les aplicó un cuestionario que incluyó las variables a considerar en el estudio (edad, ocupación, escolaridad, nivel socioeconómico, lugar de residencia, antecedentes familiares de neoplasias malignas, consumo de tabaco y/o alcohol).

4.1 Procedimientos clínicos.

A las mujeres incluidas se les realizó un examen clínico con el fin de identificar la presencia de lesiones (bucal y de cuello uterino), que fueron registradas en la ficha de recolección de datos elaborada para este fin. Los exámenes de la mucosa bucal fueron llevados a cabo por una alumna de la Maestría en Patología y Medicina Bucal de la UAM-Xochimilco. Los exámenes del cuello uterino fueron realizados por personal del Departamento de Ginecología del INCan.

En todas las mujeres se tomó un cepillado del tumor de la mucosa bucal, otro de la mucosa orofaríngea y un tercero de la mucosa de cuello uterino. La muestra de boca y orofaringe fue realizada en los consultorios del Departamento de Cabeza y Cuello del

Instituto Nacional de Cancerología. El cepillado de la mucosa de cuello uterino se realizó en el Departamento de Colposcopia del Incan por un especialista en Ginecología.

Las muestras citológicas obtenidas fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento, en el Laboratorio de Virus y Cáncer de la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, con sede en el INCan.

Se registraron las características clínicas de la neoplasia maligna (aparición, extensión, tamaño y localización), y la estadificación de acuerdo a criterios establecidos por el AJCC (AJCC). Se anotó también la sintomatología asociada al padecimiento, y el tiempo (en meses) transcurrido para la obtención del diagnóstico.

4.2 Procedimientos de laboratorio.

Extracción de ADN. Se llevó a cabo por medio del Wizard Genomic ADN Purification kit (Promega) de la siguiente manera: la muestra se centrifugó durante 5' a 16,000 rpm, para obtener una pastilla a la que se le añaden 300 μl de solución lítica nuclear, y 17.5 μl de proteinasa-k (20 mg/ml) incubando por 3 horas a 65°C en termoblock. Se agregaron 1.5 μl de RNAsa, incubando a 37°C por 30'. Se añadieron 200 μl de solución precipitadora de proteínas, y se agregaron 300 μl de isopropanol. Se retiró el sobrenadante y se lavó con 300 μl de etanol (70%). Se rehidrata con 30 μl y se incubó 65°C por una hora.

Cuantificación de ADN. La mediana de ADN obtenido en las muestras de mucosa bucal fue de 199.6 (5.0 – 1017.6) ng. La mediana de ADN obtenido en las muestras provenientes de mucosa orofaríngea fue de 108.163 (4.8 - 506.2) ng, y las de mucosa de

cuello uterino fue de 777.428 (7.6 - 5124.5) ng.

Amplificación del gen β -globina. Para comprobar la integridad del ADN obtenido, todas las muestras fueron sometidas a amplificación del gen β -globina un gen altamente conservado en las células humanas, a través del uso de los oligonucleótidos GH20/PC04, que amplifican un fragmento de 260-280 pb:

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

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

Amplificación de la región L1 de Papilomavirus. Todas las muestras obtenidas (bucales y cervicales fueron sometidas a amplificación de la región L1 del genoma del VPH, por medio de los oligonucleótidos universales MY09/MY11, que incluye los nucleótidos 6722 al 7170 del VPH-16, y las regiones correspondientes a otros tipos virales, capaces de detectar más de 25 tipos virales; dando un fragmento aproximado de 450 pb:

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 a una segunda 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:

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 de este gen (F048/R551), en un volumen final de 20 μ l, consistentes en 3 μ l de ADN muestral (100 ng), 2.5 μ l de buffer 10x, 0.5 μ l de Taq polimerasa, 10 pmol de cada primer, y 0.2 mM de dNTPs. La concentración de MgCl₂ usada fue de 2mM (2.5 μ l). Las condiciones para la realización de cada una de las reacciones de PCR fueron las siguientes: precalentamiento 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 30 μ l (5 μ l de ADN extraído como templado (100 ng), 2 μ l de buffer 10x, 1 U de Taq polimerasa (Applied Biosystems), 10 pmol de cada primer, y 0.2 mM de dNTPs).

En cada una de las reacciones de PCR mencionadas, se incluyeron de manera sistemática dos tipos de controles, un positivo (ADN de líneas celulares SiHa) y un 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, lo cual pudiera incorporar sesgos de susceptibilidad diagnóstica (datos demográficos o clínicos relevantes, etc.). Las muestras fueron preparadas y analizadas de forma paralela, 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 separados.

Reacción de secuenciación. Los productos de PCR positivos, fueron secuenciados en un termociclador programable (Mastercycler® gradient, Eppendorf) por medio del kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), usando uno de los

oligonucleótidos del PCR (GP5+ and MY09). El análisis de las secuencias fue realizado por medio del ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer System (Applied-Biosystems), y comparadas con las bases de GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) por medio del programa BLAST.

Variables

Las variables a considerar en el estudio son:

- Variable dependiente: Infección por VPH
- Variables independientes: ocupación, nivel socioeconómico, antecedentes familiares de neoplasias malignas, estadificación de la neoplasia, consumo de tabaco, consumo de alcohol, características clínicas y localización de la neoplasia maligna,.

Operacionalización de variables

- **Áreas topográficas:** Las áreas topográficas que incluye el estudio serán delimitadas de acuerdo a la décima Clasificación Internacional de Enfermedades de la OMS. Se tomó en cuenta las zonas correspondientes a la mucosa bucal (mucosa bucal superior e inferior; base, dorso y vientre de lengua; encía; piso de boca; paladar duro y blando, mucosa yugal derecha e izquierda, glándulas salivales), cuyos códigos van del CD00.3 al CD08. (Fritz, 2000)
- **Consumo de tabaco.** Las mujeres incluidas en el estudio fueron clasificadas como no fumadoras, fumadoras y ex fumadoras, tomando como base la clasificación utilizada en un estudio previo.
- **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, licor 30 ml, brandy 30 ml, mezcal 30 ml, cerveza 330 ml,

pulque 330 ml). Las mujeres incluidas en el estudio fueron clasificadas como no bebedoras, bebedoras y ex bebedoras, según la clasificación previa (Anaya-Saavedra y cols., 2008)

4.3 Análisis estadístico.

Manejo de los datos. Los datos de los cuestionarios se codificaron para su captura. Una vez que la información de los cuestionarios sea recabada en su totalidad, y se realice el trabajo de laboratorio para obtener los datos sobre los marcadores clínicos y moleculares, se elaborará una base de datos en el programa estadístico SPSS v.15.

La descripción de las variables se realizó a través de sus medidas de centralización y dispersión. Con fines descriptivos, las variables continuas se expresaron como medias aritméticas, medianas y desviaciones estándar y las variables categóricas como proporciones e intervalos de confianza al 95%. Las diferencias en las características demográficas y clínicas entre los casos positivos y negativos a VPH se analizaron por medio de la Chi cuadrada o la prueba exacta de Fisher para variables categorías, o la U de Mann-Whitney, para las dimensionales. La concordancia entre los tipos de VPH encontrados en mucosa bucal, orofaríngea y de cuello uterino, se analizó a través de la prueba de Kappa de Cohen.

5. RESULTADOS

En el presente estudio se incluyeron 10 pacientes con CB, con una mediana de edad de 61.5 (min-max:21-79,Q₁-Q₃:51.7-76.2) años. Las características demográficas y clínicas de las pacientes incluidas se describen en los Cuadros 3 y 4.

De las 10 mujeres incluidas, 4 (40%) eran analfabetas y 6 (60%) se dedicaban al hogar, 5 (50%) vivían en la ciudad de México y 5 (50%) en el estado de México. Menos de la tercera parte, (2/20%) refirieron tener antecedentes positivos de cáncer familiar en primera línea. En referencia al consumo de tabaco y alcohol, solo el 20% de las mujeres fumaban, y ninguna refirió consumo o historia de consumo de alcohol.

La presentación clínica más frecuente fue la úlcera con bordes irregulares e indurados (6/60%), seguida por placas blancas con márgenes irregulares (4/40%). Seis (60%) de los casos se presentaron en el borde lateral de la lengua, con extensión al piso de boca en dos casos. Los cuatro casos restantes se presentaron en el proceso alveolar superior, con extensión al paladar. Los principales síntomas referidos por las pacientes fueron dolor (8/80%) y disfagia (5/50%) (Cuadro 4).

El tiempo de evolución referido por las pacientes fue de tres a seis meses en seis (60%) casos, mientras que sólo dos mujeres (20%) mencionaron un periodo mayor a un año con la lesión. Siete de las 10 pacientes (70%) se encontraban en etapas tempranas de la enfermedad (I y II) y solo tres (30%) en etapas tardías. Ocho de las 10 (80%) pacientes indicó haber consultado dos profesionales de la salud antes de su referencia al INCan, mientras que dos pacientes mencionaron haber acudido al menos a siete consultas (médicos y odontólogos) antes de su referencia al INCan (Cuadro 4).

Amplificación de ADN-VPH. Como se observa en el Cuadro 5, en siete (70%) de los 10 casos se amplificó VPH-AR en al menos una de las localizaciones, 6 correspondientes a VPH-16 y una a VPH-18. Como se puede observar en el Cuadro 5, seis (60%) de las pacientes tenían VPH-AR, 4 (40%) en orofarínge y 4 (40%) en mucosa de cuello uterino. Cuatro (40%) de ellas presentaron simultáneamente VPH-AR en mucosa bucal/orofaríngea y cuello uterino.

En el Cuadro 6 se observan las características demográficas y clínicas de las pacientes incluidas, de acuerdo a su estado al VPH en la mucosa bucal. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la presencia del virus y las variables analizadas; sin embargo, las mujeres con CB positivo a VPH tuvieron una mediana de edad menor que en las que no se identificó el virus. Asimismo, en los casos positivos a VPH se identificó una menor proporción de mujeres sin antecedentes familiares de cáncer (16.7 vs. 25.0%), igualmente una menor proporción de fumadoras (16.7 vs. 25.0%), y más pacientes en estadio avanzado (IV) (50 vs. 16.7%).

Concordancia de VPH en mucosa bucal, orofaríngea y de cuello uterino.

El Cuadro 7 muestra la concordancia de VPH en los tres sitios en los que se buscó su presencia. Si bien la proporción concordancia entre la mucosa bucal+orofaríngea, y orofaríngea+cuello uterino es baja (34 y 21%, respectivamente), aumenta hasta 78%, al analizar mucosa bucal+cuello uterino (RM:16.2, IC 95%:15-20.3).

6. CUADROS Y FIGURAS.

Cuadro 1. Prevalencia de infección por VPH en cáncer bucal y orofaríngeo.

Autores, año	País	Método	No. casos	VPH +		Tipo VPH
				N	(%)	
Badaraco y cols., 2000	Italia	PCR	66	24	(36.4)	16
Ritchie y cols., 2003	USA	PCR	141	21	(15.0)	16,33
Kumar y cols., 2003	India	HIS	42	13	(31.0)	16
Correnti y cols., 2004	Venezuela	PCR	16	8	(50.0)	16
Ibieta y cols., 2005	México	PCR	50	21	(42.0)	16
El-Mofty y cols., 2006	USA	PCR	94	32	(30.0)	16, 31
Boy y cols., 2006	Sudáfrica	PCR,HIS	59	7	(11.9)	18
Rivero y cols., 2006	Brasil	PCR	23	0	(0.0)	NE
Koyama y cols., 2007	Japon	PCR	20	20	(100)	18,16
Sugiyama y cols., 2007	Japon	PCR	66	66	(100)	16
Worden y cols., 2008	USA	PCR	66	27	(40.0)	16
Fakhry y cols., 2008	USA	PCR	96	38	(40.0)	16
Anaya y cols., 2008	México	PCR	62	27	(43.5)	16,18
Machado y cols., 2010	Canada	PCR	53	2	(4.0)	16
LZ Li y cols., 2011	China	PCR	56	24	(43.0)	16
L Cheng y cols., 2011	China	HIS	56	30	(29.0)	16
Kaminagakura y cols., 2011	Brasil	PCR	114	22	(19.3)	16
Anng Lee. y cols., 2012	Japon	PCR	333	71	(21.3)	16,18
Kristoffersen y cols., 2012	Escandinavia	PCR	50	8	(16.0)	16
Ibieta y cols., 2012	México	PCR	43	16	(37.2)	16,56
Gonzalez y cols., 2013	México	PCR	80	4	(05.0)	16, 18
Chen y cols., 2013	USA	PCR	156	48	(30.8)	16

Cuadro 2. Estudios de prevalencia y concordancia sobre la presencia de VPH en diferentes localizaciones anatómicas

Autores, año	Población	VPH mucosa bucal (%)	VPH cuello uterino (%)	Tipo VPH	Concordancia (%)
Beder-Ribeiro y cols., 2013	Mujeres sanas (n=31) Pareja con lesiones genitales por VPH	(54.8)	(58.1)	ND	ND
Adamopoulou y cols., 2013	Mujeres sanas (n=43)	(44.2)	(60.5)	16	ND
Termine y cols., 2009	Mujeres sanas (n=140)	(1.4)	(2.6)	31,16	ND
Cañadas y cols., 2004	Sexoservidoras (n=188)	(7.9)	(27.8)	16	(0.72)
Matsushita y cols., 2011	Sexoservidoras (n=196)	(6.1)	(52.6)	16,56	ND
Castellsague y cols., 2009	Mujeres embarazadas (n=143) Neonatos	ND (51.6)	(46.2) (48.4) ¹	16	ND 0.93
Koshima y cols., 2012	Mujeres embarazadas (n=329) Neonatos	ND (17.9) ²	(16.4) ND	16	0.99
Rintala y cols., 2005	Neonatos (n=324)	(14.0)	(15.0) ¹	ND	ND
Smith y cols., 2004	Mujeres embarazadas (n=577)	(2.4)	(29.0)	16	ND
Fakhry y cols., 2006	Mujeres con VIH (n= 172) Mujeres sin VIH (n=86)	VIH+ (25.2) VIH- (9.0)	(76.9) (44.9)	16	ND
D'Souza y cols., 2007	Mujeres con VIH (n=136) Mujeres sin VIH (n=63)	VIH+ (33.0) VIH- (15.0)	(78.0) (51.0)	16	ND
Marais y cols., 2008	Mujeres con VIH (n=37) Mujeres sin VIH (n=78)	VIH+ (33.0) VIH- (23.6)	(97.1) (86.5)	16,33,68	ND
De Guglielmo y cols., 2013	Mujeres con infección genital por VPH (n=60)	(48.3)	(73.3)	6	(44.2)
Termine y cols., 2011	Mujeres con infección genital por VPH (n=98)	(14.3)	(100)	66, 16	(21.4)
Kellokoski y cols., 1992 ³	Mujeres con infección genital por VPH (n=309)	(3.8)	(100)	16	(1.0)
Badaraco y cols., 1998	Mujeres con lesión benigna exofítica (n=29)	(37.9)	(34.5)	16	ND
Zonta y cols., 2012	Mujeres con lesión intraepitelial (n=409)	(0.5)	(6.6)	39	ND
Abdelbaset y cols., 2012	Mujeres con lesión intraepitelial (n=50)	(2.5)	(40.0)	16,18	ND
Saini y cols., 2010 ⁴	Mujeres con CaCu (n=70)	(5.7)	ND	16	ND

En todos los trabajos se realizó citología de la mucosa examinada, y en la mayoría se se amplificó el ADN-VPH por medio de PCR. ¹Mucosa urogenital de neonatos; ²Mucosa bucal de neonatos; ³Hibridación por dot blot; ⁴Hibridación in situ.

Cuadro 3. Características demográficas y clínicas en 10 pacientes con CB.

	CB (n=10)	
	N	(%)
Escolaridad		
Analfabeta	4	(40.0)
Primaria	1	(10.0)
Secundaria	1	(10.0)
Preparatoria	1	(10.0)
Licenciatura	3	(30.0)
Ocupación		
Hogar	6	(60.0)
Estudiante	1	(10.0)
Empleada	1	(10.0)
Profesionista	2	(20.0)
Estado civil		
Casada	5	(50.0)
Soltera/Viuda	5	(50.0)
Mediana de edad (min-max) (años)	61.5 (29 – 79)	
Residencia		
Distrito Federal	5	(50.0)
Edo. de México	5	(50.0)
Antecedentes familiares de cancer		
Positivos	2	(20.0)
Negativos	8	(80.0)
Consumo de Tabaco		
Si	2	(20.0)
No	8	(80.0)

Cuadro 4. Características clínicas en 10 pacientes con CB.

	CB	
	n	(n=10) (%)
Lesión elemental		
Úlcera	6	(60.0)
Placa	4	(40.0)
Localización		
Encía	4	(40.0)
Lengua	6	(60.0)
Extensión		
No	5	(50.0)
Piso de boca	2	(20.0)
Paladar	3	(30.0)
Mediana de evolución (min-max) (meses)	2 (1 – 4)	
Tamaño categorizado		
< 2 cm	2	(20.0)
> 2cm	8	(80.0)
Signos y síntomas		
Dolor	4	(40.0)
Disfagia	1	(10.0)
Dolor y disfagia	4	(40.0)
Pérdida de peso	1	(10.0)
Estadio clinico		
I	3	(30.0)
II	4	(40.0)
III	0	(0.0)
IV	3	(30.0)

Cuadro 5. Frecuencia de VPH-16 y 18 en las mucosas bucal, orofaríngea y de cuello uterino en 10 mujeres con CB.

VPH-16 y 18	n	(%)
Mucosa bucal	2	(20.0)*
Mucosa orofaríngea	1	(10.0)
Mucosa de cuello uterino	0	(0.0)
Mucosa bucal + orofaríngea	0	(0.0)
Mucosa bucal + cuello uterino	1	(10.0)
Mucosa bucal + orofaríngea + cuello uterino	3	(30.0)

*VPH-18 en una muestra

Cuadro 6. Características demográficas y clínicas en 10 pacientes con CB de acuerdo a la presencia de VPH.

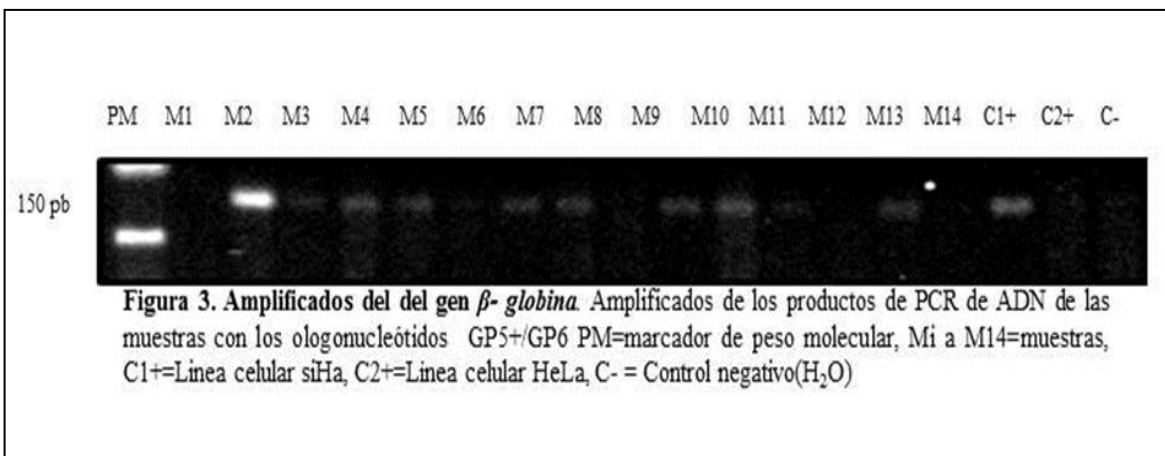
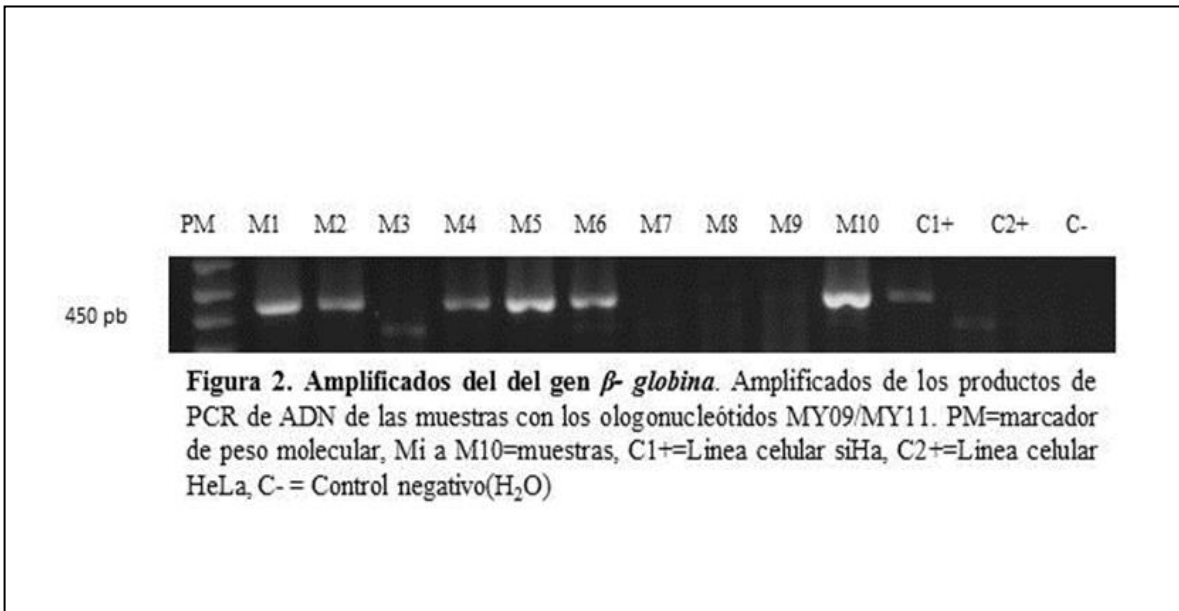
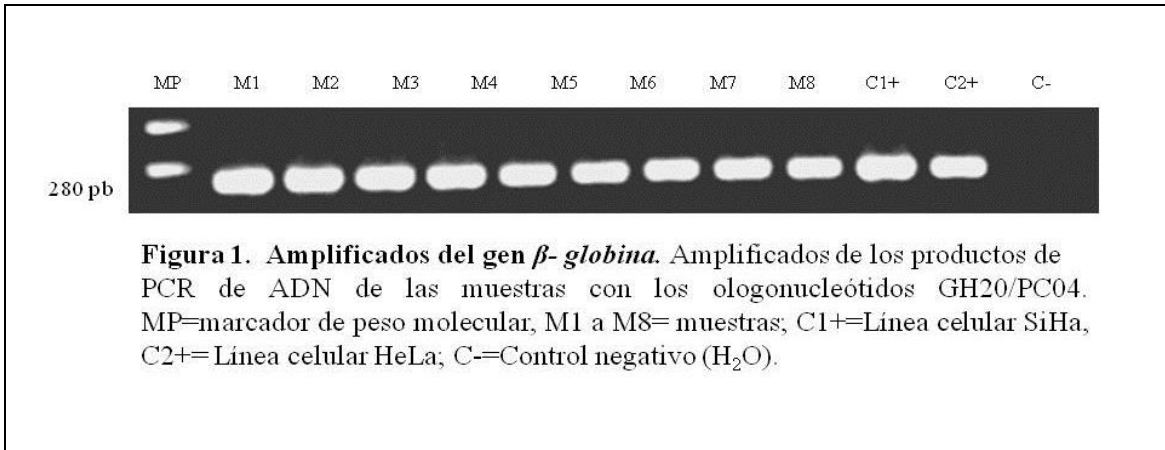
	VPH+	CB VPH-	<i>P</i>
	(n=6)	(n=4)	
	n (%)	N (%)	
Ocupación			
Hogar	3 (50.0)	3 (75.0)	0.290 ^a
Estudiante	0 (0.0)	0 (0.0)	
Empleada	2 (33.3)	1 (25.0)	
Profesionista	1 (16.7)	0 (0.0)	
Mediana de edad (min-max) años	61.5 (29-77)	67 (55-79)	0.678 ^b
Estado civil			
Casada	3 (60.0)	2 (50.0)	0.738 ^c
Soltera	2 (40.0)	2 (50.0)	
Antecedentes heredo-familiares			
Positivos	1 (16.7)	1 (25.0)	0.667 ^c
Negativos	5 (83.3)	3 (75.0)	
Consumo de Tabaco			
Si	1 (16.7)	1 (25.0)	0.667 ^c
No	5 (83.3)	3 (75.0)	
Localización			
Lengua	4 (66.7)	2 (50.0)	0.548 ^c
Encía	2 (33.3)	2 (50.0)	
Tamaño categorizado			
< 2 cm	0 (0.0)	2 (50.0)	0.133 ^c
> 2 cm	6 (100)	2 (50.0)	
Síntomas			
Dolor	2 (33.3)	2 (50.0)	0.439 ^a
Disfagia	1 (16.7)	0 (0.0)	
Dolor y disfagia	3 (50.0)	1 (25.0)	
Pérdida de peso	0 (0.0)	1 (25.0)	
Estadio clínico			
I	1 (16.7)	2 (50.0)	0.108 ^b
II	4 (66.7)	0 (0.0)	
III	0 (0.0)	0 (0.0)	
IV	1 (16.7)	2 (50.0)	

^aChi-cuadrada, ^bU-Mann-Whitney, ^cPrueba exacta de Fisher

Cuadro 7. Concordancia entre la presencia de VPH-16 en mucosa bucal, orofaríngea y de cuello uterino, razones de momios y sus intervalos de confianza al 95%.

		Kappa	RM	(IC 95%)
CB (n=10)	Mucosa bucal y orofaríngea	0.34	1.07	(0.90 – 1.27)
	Mucosa orofaríngea y de cuello uterino	0.21	1.18	(0.97 – 1.43)
	Mucosa bucal y de cuello uterino	0.78	16.2	(15 – 20.3)

FIGURAS



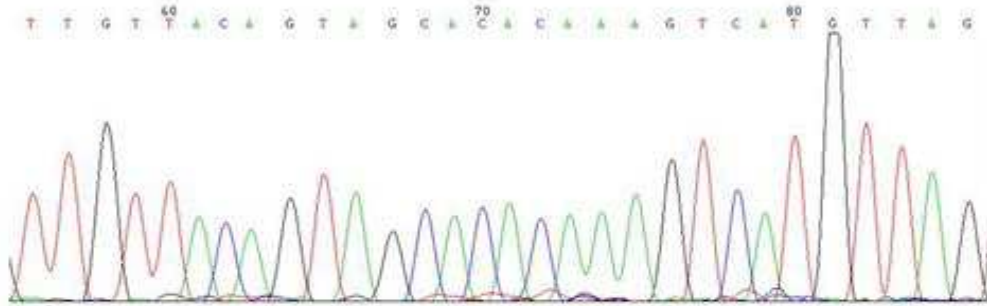


Figura 4. Electroferograma de muestra de cáncer bucal positivo a VPH-16, amplificado con los oligonucleótidos GP5+/GP6+.

8. Discusión

En el presente estudio, que analiza la concordancia de infección por VPH bucal y cervicouterina en mujeres con cáncer bucal, se identificó una alta frecuencia de VPH-AR (70%) en la mucosa bucal y una concordancia del 78% para la presencia del virus en ambas localizaciones anatómicas.

Las mujeres con CB tuvieron una mediana de edad de 61.5 años, estos datos concuerdan con la mediana de edad de 58 años reportada previamente (Gaytan, 2011 Maciejewski y cols., 2010). Sin embargo, en el presente estudio se incluyó una mujer con CB de 28 años, sin antecedentes heredo-familiares de cáncer, consumo de tabaco o alcohol, quien presentó infección por VPH tipo 18 en mucosa bucal. En estudios recientes se ha informado una disminución en la edad de presentación de CB, particularmente en mujeres en ausencia de los factores de riesgo tradicionales, tales como tabaco y alcohol. (González- Ramirez y cols., 2012; Patel y cols., 2011; Dayyani y cols., 2011; Llewelyn, 2011; Kruze, 2010; Ringstrom, 2002)

En cuanto al nivel de escolaridad, casi la mitad de las mujeres incluidas en el presente estudio eran analfabetas. Se ha sugerido que la falta de cuidado a la salud es directamente proporcional al nivel de educación e inversamente proporcional a la prevalencia de los factores de riesgo particularmente por la influencia del estilo de vida. (Johnson, 2012; Herrera y cols., 2012; Conway, 2010; Bernard, 2008; Palacio, 2003)

Es importante resaltar que en nuestros resultados, una baja proporción de pacientes con CB (3/30%), se encontraban en etapas avanzadas de la enfermedad, de manera similar al 43.7% reportado recientemente (Gonzalez y cols., 2013). Lo anterior, difiere de lo informado previamente en México y el mundo, en estudios que indican que más del

60% de los casos de CB se detectan en etapas avanzadas. (Ibieta y cols., 2012; Seoane y cols., 2012; Shenoi y cols., 2012; Akbolut y cols., 2011; Goon y cols., 2009; Anaya-Saavedra y cols., 2008; Ramírez-Amador y cols., 1995), lo cual resulta contradictorio si consideramos las características de la cavidad bucal, un área accesible al examen clínico, y que no requiere exámenes complejos (Falaki, 2011).

Menos de la mitad de las pacientes con cáncer refirieron tener antecedentes familiares positivos de cáncer (20%). A este respecto, aunque se ha reportado que en aproximadamente un 10% de todos los tipos de cáncer se asocian con carga genética; (Mork y cols., 1999) Se han estudiado las alteraciones genéticas como factor de riesgo en el desarrollo del cáncer, estas definen las bases moleculares de la carcinogénesis, las cuales incluyen mutaciones, amplificaciones, rearrreglos y deleciones del ADN, que pueden contribuir a la susceptibilidad genética para desarrollar carcinoma escamocelular de cabeza y cuello. (Kostrzewska, 2012; Ferreira, 2012; Pfeiffer, 2011; Ram, 2011) lo que lleva a la pérdida de función de diversos genes supresores tumorales o activación de oncogenes, estos cambios acumulativos pueden producir atipia y eventualmente cáncer (Ferreira, 2012; Pfeiffer, 2011).

Las variaciones genéticas de los mecanismos protectores contra el cancer pueden estar implicados en la carcinogenesis, tales mecanismos protectores pueden fallar y por lo tanto predisponer al al desarrollo del cáncer, entre estos los genes para las enzimas hepáticas, que degradan los carcinógenos químicos, los genes capaces de reparar las mutaciones del ADN, los genes que controlan el crecimino descontrolado de las células cancerígenas o los genes relacionados con la protección inmune (Scully, 2010).

En CB, el consumo de tabaco y alcohol, las infecciones virales, los factores nutricionales, y en algunos casos predisposición a la inestabilidad genética, como mutaciones o pérdida de la secuencia de ADN, puede traducirse en cáncer. (Ha, Califano, 2004)

Como está bien documentado, el consumo de tabaco y alcohol son los principales factores de riesgo para el desarrollo del cáncer bucal. (Ram, 2011) En el presente estudio, la mayoría de las mujeres no fumaban (80%) y ninguna consumía alcohol, datos similares a lo reportado por Kruse y cols., (2012) quien refiere que de 278 pacientes con CB analizados, 67 no tenían historia de consumo de tabaco ni alcohol y el 67% de estos pacientes sin factores de riesgo conocidos fueron mujeres (Kruse y cols., 2010; Ringstrom, 2008).

En más de la mitad de las muestras de CB (60%) se identificó VPH-AR en la mucosa bucal, y 70% si consideramos mucosa bucal y orofaríngea. Estas frecuencias son más altas que las reportadas en estudios previos realizados en población mexicana atendida en el mismo centro de referencia (Gonzalez y cols., 2013; Ibieta y cols., 2012; Anaya-Saavedra y cols., 2008; Ibieta y cols., 2005) que van del 5 al 43%. Uno de los factores que pudiera haber influido en la alta frecuencia encontrada en el presente trabajo es el tamaño de la muestra que es menor a los anteriores, ya que se ha sugerido que la prevalencia de VPH es inversamente proporcional al tamaño de la muestra (Kreimer y cols., 2005).

A nivel mundial, en la última década, la frecuencia de VPH en CB se ha reportado de 4% a 80%. (Machado y cols., 2010; Termine y cols., 2008) Adicionalmente, diversos meta-análisis de la prevalencia de VPH en cáncer bucal han informado cifras que van

desde 21.5% hasta 34.5%. (Dayyani y cols., 2010; Jayaprakash y cols., 2011; Termine y cols., 2011; O'Rorke y cols., 2012)

En una revisión sistemática realizada por Syrjanen S. (2011) se encontró que la probabilidad de desarrollar cáncer bucal cuando se presenta infección bucal por VPH-AR es de 3.98 (2.62-6.02 IC: 95%) y al analizar específicamente el VPH-16 aumenta hasta 4.4 (2.87-9.70 IC:95%), es decir que los pacientes tienen 4.4 más veces de posibilidades de riesgo de desarrollar cáncer, que los pacientes que no presentan infección. (Dayyani y cols., 2010)

Entre los factores que influyen en las diferencias reportadas se encuentra el tamaño de la muestra, 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, las técnicas utilizadas, el tejido analizado, la población, el método de purificación de ADN y los ensayos moleculares utilizados para la detección del ADN viral. (Termine y cols., 2008; Kreimer y cols., 2005; Syrjanen y cols., 2005)

Con respecto al método de obtención y procesamiento de la muestra, se ha observado que el cepillado citológico es más representativo en comparación con la biopsia de tejido tumoral, y que la PCR es uno de los métodos más sensibles para identificar secuencias virales. (Termine y cols., 2012) Lo anterior resulta de gran utilidad ya que en el presente estudio se utilizó cepillado citológico como método para la recolección de las muestras, y todas fueron procesadas por PCR, utilizando un control positivo y negativo en cada reacción.

En contraste con lo reportado en CB, el VPH tiene una asociación más fuerte con el desarrollo de cáncer orofaríngeo, la probabilidad de desarrollar cáncer en la mucosa orofaríngea aumenta 14.6 veces cuando el virus está presente (6.3-36.6 IC:95%). (Haddad, 2008; D' Souza, 2007) La frecuencia de VPH en cáncer orofaríngeo varía de 41 a 84%. (Chaturvedi y cols., 2011; Dayyani y cols., 2010; Syrjanen, 2004) Se ha sugerido que la similaridad del epitelio amigdalino con la mucosa cervicouterina y el hecho de que ambas comparten características similares debido a su origen en el endodermo, la hacen más susceptible a la exposición e infección por el VPH, esta superficie mucosa contiene profundas invaginaciones en su superficie, lo que puede atrapar y procesar los antígenos y por lo tanto facilitar el acceso viral a las células basales. (Chaturvedi y cols., 2011; Haddad, 2008)

En el presente estudio, el VPH-16 fue el tipo viral más frecuente en los tres sitios analizados (85.7%), lo cual concuerda con estudios que mencionan que el VPH-16 constituye del 85 al 95% de los casos de CB positivos a VPH (Dayyani y cols., 2011; Psyrii, 2008; Kreimer, 2005) y del 50 al 60% de los casos de cancer cervicouterino. (Faridi, 2011; Zhang y cols., 2010; Gheit y cols., 2009; Psyrii, 2008) Se ha propuesto que el VPH-16 es el tipo más persistente, oncogénico e inmunogénico de los papilomavirus. (Louvanto y cols., 2011; Marklund, 2011; Psyrii, 2008; Smith y cols., 2004; Mellin y cols., 2002) En nuestros resultados solamente una paciente con CB (1/10%) presentó infección por VPH-18 en la mucosa bucal, lo que concuerda con la literatura que refiere que el VPH tipo 18 es el segundo más común en cáncer de cabeza y cuello, se ha reportado en 2.8 a 18.5%. (Anaya-Saavedra y cols., 2008; Kreimer y cols., 2005)

Respecto al papel del tabaco y la infección por VPH en el CB, estudios previos han

informado que la presencia de VPH en CB tiende a ser mayor en pacientes no fumadores (Zygianni y cols., 2011; Michl, 2010). En nuestro estudio, el 83.3% de las pacientes con CB-VPH+ no consumían tabaco, similar a lo reportado en estudios previos que han analizado la presencia de VPH en pacientes con CB sin historia de consumo de estas sustancias. (Ragin, 2007) Se ha sugerido que, independientemente de su efecto oncogénico en la mucosa bucal, el tabaco podría ejercer un efecto protector en la mucosa bucal, impidiendo la entrada del virus al epitelio. (Zygianni, 2011, Pannone, 2011; Zha, 2009; Castle, 2008; Romanitan, 2008; Applebaum, 2007; Kreimer, 2005; Gillison, 2004; Ritchie 2003)

Concordancia entre los tipos de VPH encontrados en la mucosa bucal, orofaríngea y cervicouterina

La frecuencia de 60% de VPH en la mucosa bucal encontrada en el presente estudio es similar a las prevalencias reportadas en estudios previos, como el 54.8% de Beder-Ribeiro y cols., (2013), el 51.6% de Castellsague y cols., (2009), o el 44.2% de Adamapoulou y cols. (2013), todos realizados en mujeres sin alteraciones en la mucosa de cuello uterino. Sin embargo, otros estudios han encontrado frecuencias tan bajas como 2.4% (Smith y cols., 2004) y 0.5% (Zonta y cols., 2012). Llama la atención que las frecuencias de infección en mucosa bucal más bajas (0.5 a 5.7%) han sido reportadas en estudios realizados en mujeres con lesión intraepitelial o cáncer de cuello uterino (Zonta y cols., 2012; Saini y cols., 2010; Badaraco y cols., 1998), esto en contraste con nuestros resultados, lo que puede sugerir diferentes factores sistémicos implicados en la predisposición para la infección y transmisión del virus en ambas mucosas.

Por otro lado, la frecuencia de VPH en el cuello uterino de las mujeres con CB del presente estudio fue de 40%, similar al 44.9% (Fahkry y cols. 2006) y al 51% (D'Souza

y cols., 2007) encontrados en mujeres sin VIH. Un hallazgo importante del presente estudio fue la alta concordancia (78%) de VPH-AR encontrada entre la mucosa bucal y la de cuello uterino de las mujeres con CB, similar al 72% reportado por Cañadas y cols., (2004); sin embargo, en dicho estudio la prevalencia de VPH en la mucosa bucal fue muy bajo (7.9%) en comparación del 60% encontrado en el presente. Solo cinco estudios (Koshima y cols., 2012, Termine y cols., 2009; Castellsague cols., 2009; Cañadas y cols., 2004; Kellokoski cols. 1992) reportan un índice de concordancia entre las localizaciones estudiadas, que varía de 1.0% (Kellokoski y cols., 1992) a 93% (Castellsague y cols., 2009) y 99% (Koshima y cols., 2012).

Se han planteado diferentes hipótesis acerca de las vías de transmisión del VPH a la mucosa bucal (la transmisión perinatal, autoinfección bucal-genital, transmisión sexual bucal-genital) (Miletic, 2006; Mollano y cols., 2003; Badaraco 1998).

Entre las limitantes del presente trabajo se encuentra el reducido tamaño muestral, mismo que era esperable debido a que el cáncer bucal no es una enfermedad de incidencia elevada en nuestro país; sin embargo, resulta importante la información obtenida, particularmente si consideramos la ausencia de estudios que analicen la mucosa de cuello uterino en mujeres con CB. Otra limitante es la ausencia de información acerca de los hábitos sexuales de las mujeres del estudio, pues la mayoría de las pacientes incluidas refirieron tener bajo nivel educativo, lo que condiciona al pobre entendimiento del motivo del cuestionario.

La alta prevalencia de infección por VPH-AR encontrada en las mujeres con CB, así como el alto grado de concordancia entre los sitios analizados, pudiera sugerir que el estado inmune de las pacientes con CB está debilitado y predispone a presentar

infección por VPH en más de una localización anatómica, así como que la transmisión sexual en estos pacientes juega un papel importante. Los resultados del presente trabajo sugieren la necesidad de analizar los subtipos virales, así como el estado de integración viral.

Conclusiones

- Considerar que en las mujeres con cáncer, independientemente del sitio en el que lo presenten, el sistema inmunológico está debilitado, lo que facilita la presencia del virus en diferentes sitios así como su persistencia.
- La alta concordancia entre los tipos de VPH encontrados en los tres diferentes sitios mucosos analizados en las pacientes con cáncer nos sugiere además de la transmisión sexual, la posibilidad de auto inoculación
- El VPH 16 ha sido el más frecuentemente encontrado en infecciones concurrentes, lo que nos lleva a la necesidad de secuenciar subtipos y variantes de VPH-16 en infecciones concordantes, lo cual permitiría concluir de manera más específica si la autotransmisión es el mecanismo de llegada del virus a la mucosa bucal.